

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de l'interaction de la protéine WAK1 avec la paroi cellulaire végétale

RANSBOTYN, Vanessa

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTEINE WAK1
AVEC LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Vanessa RANSBOTYN

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INTERACTION DE LA PROTEINE WAK1
AVEC LA PAROI CELLULAIRE VEGETALE**

RANSBOTYN Vanessa

Résumé

Lors de l'analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana*, cinq gènes Wak ont été identifiés. Ces gènes codent pour des récepteurs sérine/thréonine kinases transmembranaires. Par sa localisation en membrane et par son contact avec la paroi, le récepteur Wak1 pourrait jouer un rôle dans la communication extracellulaire de la cellule végétale. Un des ligands potentiels de ce récepteur est la pectine, un des constituants majeurs de la paroi cellulaire végétale, jouant le rôle d'éliciteur dans de nombreuses réponses physiologiques. Il serait donc intéressant de savoir si le récepteur Wak1 participe à la transduction du signal initiée par la pectine ou les fragments pectiques.

Pour contribuer à l'étude de l'interaction de Wak1 avec la pectine, nous avons construit un récepteur hybride wak1-bri1, Bri1 étant un récepteur végétal sensible aux brassinostéroïdes. Dans un premier temps, nous avons cloné les séquences codant pour les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire du gène *Wak1* et la séquence codant pour le domaine kinase du gène *Bri1*. Ces deux séquences ont ensuite été jointes pour générer une séquence hybride qui a été clonée dans le plasmide Ti pour la transformation de culture en suspension d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium*. Dans un second temps, nous avons débuté la mise au point de la technique RT-PCR qui servira à mesurer l'augmentation ou la diminution du niveau de transcription de deux gènes de réponse aux brassinostéroïdes : le gène de la cycline *CycD3* et le gène du facteur de transcription *BRH*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: J. Messiaen

Je tiens avant toute chose à remercier Johan Messiaen pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie aussi pour sa disponibilité, ses conseils et toutes ces corrections.

Je tiens ensuite à remercier Catherine pour m'avoir aidée et conseillée à plusieurs reprises, Pierre pour ta bonne humeur quotidienne et pour m'avoir enseigné l'art du repiquage des cultures en suspension, merci aussi à Nicolas pour le temps passé à séquencer (personne ne séquence aussi bien que toi !). Je remercie aussi toute l'équipe de l'URBV, travailler avec vous a été très enrichissant.

Merci aux autres mémorants, Alexia, Céline, Vincent et Yves pour la bonne ambiance et surtout pour les bons moments passés ensemble.

Merci à Céline, Audrey V., et In pour être toujours présentes, je sais que l'on peut toujours compter sur vous. Non je ne t'ai pas oubliée, Audrey merci pour ces quatre années passées ensemble. Tu as toujours été là quand il fallait. Merci à toutes les quatre, sans votre soutien mutuel, ça n'aurait pas été si drôle!

Merci à mes parents sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci à la maman d'Audrey pour ses corrections orthographiques. Merci à toi chou pour ton écoute et ta patience,

Vanessa

Table des matières

I. Introduction	7
A ; Les récepteurs chez la cellule végétale	7
1. Description générale des récepteurs de plantes	8
2. Classification des récepteurs kinases des plantes	12
B. Les récepteurs Waks	27
1. Structure	27
2. Expression de Wak	29
3. Interaction de Wak avec la matrice extracellulaire	32
4. Les rôles de Wak	34
C. Comment aborder l'étude de l'activation de Wak1 par la pectine ?	39
D. Objectifs du mémoire	43
II. Matériel et Méthodes	45
A. Culture en suspension de cellules végétales	45
1. Arabidopsis thaliana écotype Landsberg erecta (L-MM1)	45
2. Arabidopsis thaliana écotype (A-TL)	45
B. Culture d' E.Coli	45
1. Milieu LB liquide (pour 1l)	45
2. Transformation d'E. coli TOP 10F'	45
C. Culture d'Agrobacterium tumefaciens (LBA4404 et LBA4404/virG)	46
1. Préparation de cellules électrocompétentes	46
2. Electroporation d'Agrobacterium tumefaciens	47
D. Méthodes relatives aux acides nucléiques	47
1. Miniprep d'ADN plasmidique :	47
2. Maxiprep d'ADN plasmidique	48
3. Quantification des acides nucléiques	48
4. Electrophorèse sur gel d'agarose d'ARN ou d'ADN	49
5. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose (Protocole QIAEX)	49
6. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose (Protocole Nucleospin)	50
7. Purification d'ADN sur colonne « microcon »	50
8. Extraction d'ARN par la méthode TriPure™ (Roche)	50
9. RT-PCR	51
10. Réaction de ligation	53
11 Réaction de séquençage	53

E. Méthode relative à la transformation des végétaux	55
1. Transformation de cellules végétales cultivées en suspension	55
III. Résultats.....	57
A Définition des amorces PCR	57
1. Analyse in silico de Wak1 et Bri1	57
2. Définition des amorces PCR Wak1 et bri1	63
B. Clonage du domaine extracellulaire de Wak1 dans pCRII®	63
C. Clonage du domaine kinase de bri1 dans pCRII®	65
D. Clonage du fragment Wak1-Bri1 dans pCRII®	69
E. Clonage du fragment Wak1-bri1 dans pBI121	70
F. Transformation de culture en suspension.....	75
G. Cinétique de transcription des gènes CycD3 et BRH	78
1 Mise au point de la RT-PCR semi-quantitative	78
2. Cinétique de transcription des gènes CycD3 et de BRH dans les cellules non transformées.....	88
IV. Conclusion et perspectives.....	90
V. Bibliographie	93

I. Introduction

I.

Introduction

A. Les récepteurs chez la cellule végétale

Une des observations les plus surprenantes faites récemment lors des différents projets de séquençage de génomes de plantes (The *Arabidopsis Genome Initiative* 2000) est la prédiction d'un grand nombre de séquences codant pour des récepteurs kinases. De plus, les récepteurs présents à la surface des cellules végétales appartiennent à des familles de récepteurs qui ne sont pas forcément celles que l'on retrouve à la surface des cellules animales (Cock *et al.* 2002 et Shin-Han *et al.* 2001).

On retrouve, chez les cellules animales, une centaine de récepteurs couplés aux protéines G (récepteurs à sept domaines transmembranaires) tandis que chez *Arabidopsis thaliana*, seulement dix-huit récepteurs couplés à une protéine G ont été identifiés et tous seraient impliqués dans la résistance au mildiou. Par ailleurs, le génome d'*Arabidopsis* ne contiendrait qu'une seule séquence de G_α et de G_β . Aucune séquence ne présente d'homologie suffisante avec G_γ , mais des données expérimentales suggèrent l'existence d'un équivalent de G_γ . *Arabidopsis thaliana* ne pourrait donc former qu'une seule protéine G fonctionnelle. Les récepteurs à guanylate cyclase ou récepteurs avec un domaine tyrosine kinase ou phosphatase semblent être absents chez les cellules végétales tandis qu'ils se trouvent en nombre chez les métazoaires (Barrit 1992). Par contre, un type de récepteur particulièrement abondant chez la cellule végétale, et qu'on retrouve aussi chez les cellules animales, est le récepteur à sérine/thréonine kinase (Cock *et al.* 2002).

Assez curieusement, le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a également révélé l'existence d'un nombre considérable de récepteurs à deux composants membranaires ou solubles similaires à ceux des bactéries et des levures (Schaller 2000).

Même si les récepteurs sont différents, leur rôle fondamental est de permettre aux organismes multicellulaires, aussi bien animaux que végétaux, de gérer divers processus physiologiques de façon coordonnée dans un environnement changeant. La cellule végétale devra cependant faire face à des signaux intra - et extracellulaires complexes et différents de ceux rencontrés par la cellule animale (Lease 1998). Ceci explique en partie pourquoi seulement un nombre limité de voies de transduction du signal des cellules animales puissent être transposées chez les cellules végétales. Les récepteurs identifiés par l'étude génomique sont soit reliés à des voies de transduction propres aux cellules végétales, soit à des voies composites (combinaisons de plusieurs modules différents de transduction du signal), soit demeurent orphelins (la majorité des cas). Les récepteurs kinases des plantes actuellement les mieux caractérisés sont ceux impliqués dans la régulation des étapes du développement, l'élongation cellulaire, la perception des hormones, la résistance aux pathogènes et la reconnaissance du soi (Cock *et al.* 2002 et Lease 1998). Ces différents récepteurs seront décrits plus loin.

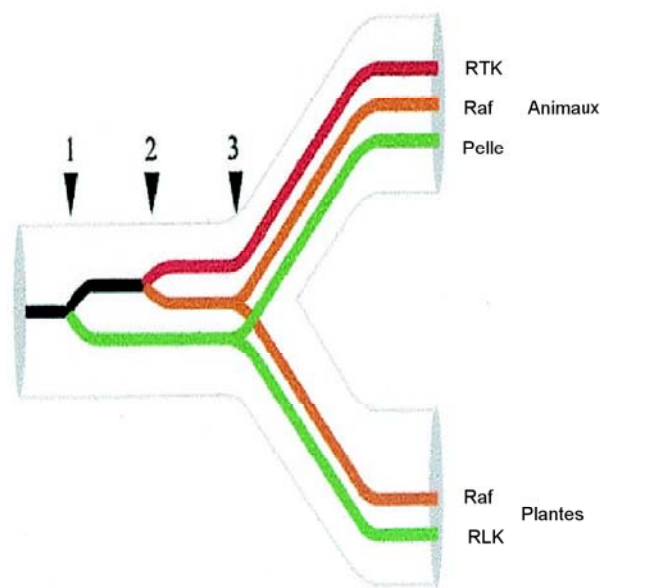


Figure 1 : Arbre phylogénétique des récepteurs de plantes montrant leur évolution indépendante des familles de récepteurs kinases du règne animal. Trois grands événements moléculaires (représentés par les flèches) auraient permis à ces récepteurs de se diversifier : le premier serait une duplication du matériel génétique qui a permis aux récepteurs sérine/thréonine kinase de diverger des récepteurs tyrosine kinase ; le deuxième est une duplication des gènes plus « récente » qui a permis au Raf kinase de se différencier des tyrosines kinases et le troisième est la séparation entre les récepteurs « animaux » et « végétaux » (Shin-Han *et al.* 2001)

1. Description générale des récepteurs de plantes

Un récepteur kinase de plante (PRKs) possède habituellement un domaine extracellulaire, un ou plusieurs domaines transmembranaires et un domaine kinase cytosolique. En cela leur structure ressemble à celle des récepteurs tyrosine et sérine/thréonine kinase des cellules animales. Bien que leur structure soit semblable, leur origine et leur nombre sont très différents. Il existe chez *Arabidopsis thaliana* 417 gènes codant pour des récepteurs avec un domaine kinase de type eucaryotique (Cock *et al.* 2002 et Becraft 2002) pour 43 chez *Caenorhabditis elegans*, 25 chez *Drosophila melanogaster*, et 90 chez l'homme (Becraft 2002).

Des analyses phylogénétiques des récepteurs de plantes indiquent que ceux-ci ont évolué indépendamment des familles de récepteurs kinases du règne animal (Shin-Han *et al.* 2001 et Cock *et al.* 2002). Il y aurait eu au cours de leur évolution, trois grands événements :

- Le premier correspondrait à une duplication du matériel génétique qui a permis aux récepteurs sérine/thréonine kinase de diverger des récepteurs tyrosine kinase ;

- Le deuxième serait une seconde duplication plus « récente » des gènes qui a permis au Raf kinase de se différencier des tyrosines kinases ;
- Le troisième serait la séparation entre la lignée des récepteurs animale et végétale (figure 1).

Bien qu'il existe des différences fonctionnelles évidentes entre le signaling des récepteurs kinases des deux règnes, les récepteurs des plantes et des métazoaires partagent des points communs (Cock *et al.* 2002). D'un point de vue structurel, les membres d'une même famille de récepteurs peuvent partager un domaine kinase homologue alors que le domaine extracellulaire peut être très diversifié. Par exemple pour les cellules végétales, les récepteurs Wak (1-5) ont un domaine kinase homologue à 86 % tandis que le domaine extracellulaire ne présente que 40 – 64 % d'homologie (Lally *et al.* 2001). Chez les cellules animales, la famille des récepteurs EGF présente ces mêmes caractéristiques (Plowman *et al.* 1993). D'un point de vue fonctionnel, les modes d'activation et de régulation d'une voie de transduction du signal peuvent être similaires. Par exemple, le récepteur SRK, impliqué dans la réponse de compatibilité pollinique, voit son activité autocatalytique inhibée par TH2, une thioredoxine, qui se lie à un domaine conservé en cystéines du domaine transmembranaire de SRK. Ce même mécanisme est utilisé par FKBP12 (FK506-binding protein) qui se lie au domaine GS, segment régulateur riche en glycine et en sérine du récepteur TGF β R-I des cellules animales. Comme pour SRK, la liaison de FKBP12, inhibe l'activité autocatalytique de TGF β R-I. Ces similarités indiquent une évolution fonctionnelle convergente impliquant des acteurs différents répondant à des problèmes moléculaires de signalisation fondamentaux imposés par l'environnement dans lequel les cellules animales et végétales évoluent (Cock *et al.* 2002, Schiller *et al.* 2004).

Vu le nombre important de récepteurs kinases présents chez *Arabidopsis*, différents modes de classement ont été proposés.

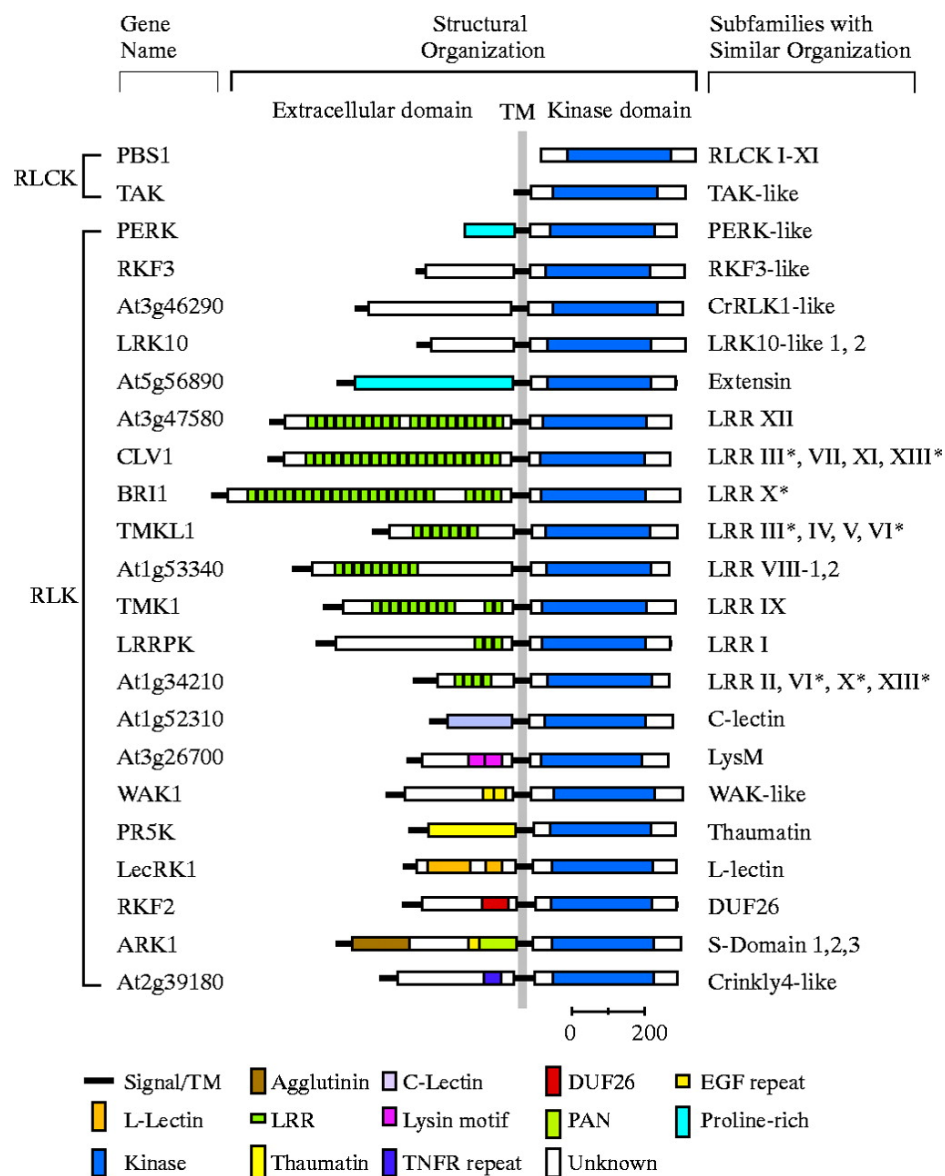


Figure 2 : Schéma représentant les différents domaines de quelques récepteurs sérine/thréonine kinase de plantes.

Cf9	L--L--L--LDLS-N-L-G-IP--	27 (23,4)
BRI1	φ--φ--L--L--LS-N-φSG-IP--	25 (21,4)
XA21	φ--φ--L--L--L--N-LSG-IP--	23
CLV1	φ--φ--L--L--φ--N-φTG-IP--	23
RLK5	L--L--L--L--L--N-LSG-IP--	21
ERECTA	LG-L--L--L--L--N-L-G-IP--	20
TMK1	L--L--L--L--L--N-φ-G-IP--	11 (9,2)
RKF1	φ--L--L--φ--L--N-L-GTIP--	13
LTK1, 2	φ--φ--L--L--L--N-φ-G----	8 (1,7)
LePRK1	L--φ--φ--NN-φ-GPIP--	6
LePRK2	L--L--φ--NN-L-GPIP--	5
PRK1	L--L--φ--L--L--NN--G-IP	5 (1, 2, 2)
SERK	L--L--L--L--L--NN-φSGPIP--	5

Extracytoplasmic LRR consensus:
L--L--L--L--L--N-L-G-IP--

Cytoplasmic LRR consensus:
L--L--L--L--L--(N/C/T)-()L--IP--

Figure 3 : Alignement de plusieurs domaines LRR de récepteurs kinase de plantes. Cet alignement permet de mettre en évidence une séquence consensus pour les domaines LRR présents dans le domaine extracellulaire de récepteurs kinase et de protéines cytosoliques contenant également un domaine LRR (Torii et al. 2000).

Figure 4 : Alignement de plusieurs domaines LRR de plantes. Cet alignement permet de mettre en évidence deux paires de résidus cystéine conservés : la première paire se trouve plus ou moins soixante acides aminés après le début de la protéine et la deuxième se trouve entre le 20ème et le 30ème acide aminé du domaine transmembranaire. Le rôle de ces résidus cystéine serait de former des ponts disulfures lors de la dimérisation du récepteur (Torii et al. 2000).

1st		2nd
CSFSGVSC	--LRR--	CLPHRVSC
CTFDGVTG	--LRR--	CGYPLPRC
CVWRGVSC	--LRR--	CGSWLNSPC
CKWTHIVC	--LRR--	CLSSPGECC
CKWLGIVSC	--LRR--	CVDLDGLCC
CFHHQLSC	--LRR--	CGKPLESACC
CSWYGVSC	--LRR--	
CTWVGIVC	--LRR--	CGPVTGRPC
CDKKTDRPNWDNVIC	--LRR--	CDGPFSKCC
CVKDNNKPKWNNLFC	--LRR--	CGPPLAKSC

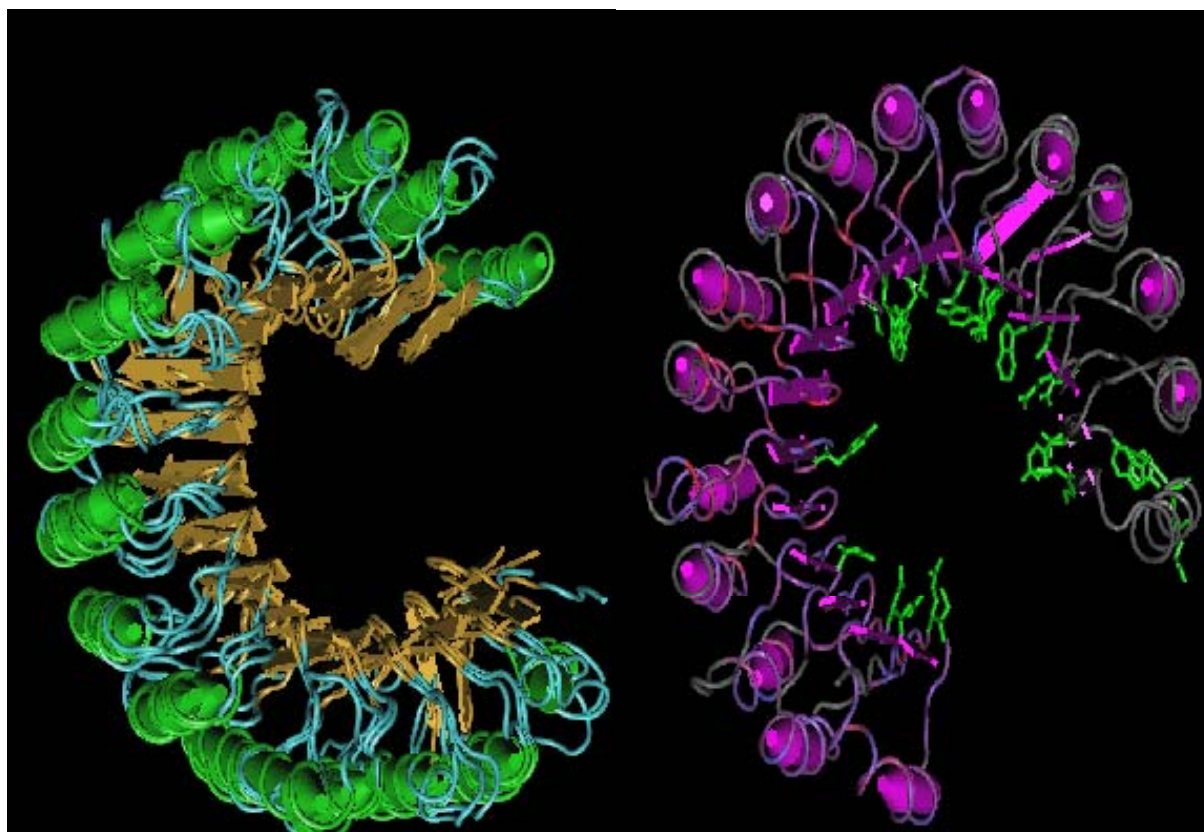


Figure 5 : Représentation en 3D d'un domaine LRR. La structure tridimensionnelle de ce domaine est définie par la succession alignée et parallèle de plans β reliés par une boucle à une hélice α qui est parallèle au plan β . (NCBI-CDC).

2. Classification des récepteurs kinases des plantes

Les récepteurs kinases des plantes peuvent être classés selon deux critères. Le premier critère de classement se base sur le domaine extracellulaire et ses sous-domaines. Parmi les vingt structures extracellulaires distinctes qui ont été identifiées dans la super-famille des récepteurs de plante, les domaines riches en leucine (LRR), le domaine S (la reconnaissance du soi), le domaine DUF26 (Domain Unknown Function), domaine EGF (Epithelium Growth Factor), les domaines lectine, les domaines PAN (Plasma-Appeal-nematode) sont les plus représentatifs (figure 2). Les autres domaines Agglutinine, Thaumatin (domaine homologue à la protéine PR5) impliqué dans la réponse contre les pathogènes) (Wang *et al.* 1995), lysine (impliqué dans l'infection bactérienne par *Rhizobium*) (Spaink *et al.* 2000), les domaines riches en proline (fonction inconnue) (Schulze *et al.* 1996) sont souvent représentés par un seul exemplaire dont la fonction n'est pas encore connue (Cock *et al.* 2002 et Becraft, 2002). Ces derniers ne seront pas décrits dans les paragraphes suivants.

Le deuxième critère de classement se base sur le domaine kinase. Ce sont pour la plupart des récepteurs sérine/thréonine kinase (417 chez *Arabidopsis*) et des systèmes à deux composants à histidine kinase (11 chez *Arabidopsis*) (voir page 5).

Classification par domaines extracellulaires

a) Le domaine riche en leucine ou domaine LRR

Le domaine LRR est très répandu ; on le retrouve aussi bien dans des protéines bactériennes qu'humaines (Diévert *et al.* 2003 et Torii *et al.* 2000). Les domaines LRR peuvent être classés en sept grandes familles selon le motif consensus et le nombre de résidus leucine répétés. Une de ces familles est spécifique des plantes (Diévert *et al.* 2003).

Il existe chez *Arabidopsis* 216 récepteurs ayant un domaine riche en répétition de leucine. Ils sont classés, selon l'organisation du domaine, en treize sous famille (LRR I-XIII). Les récepteurs Bri1, clavata 1 et FLS22, dont nous reparlerons ultérieurement, font partie des sous-familles LRR X, XI et XII (Diévert *et al.* 2003 et Torii *et al.* 2000).

Le domaine riche en leucine de ces récepteurs est constitué d'environ 23-25 répétitions du motif consensus L - - L - - L - - L - L - -N - L - G - I P - - (figure 3) (Torii *et al.* 2000). En plus de ce consensus de répétition, on retrouve deux paires de résidus cystéine conservés. La première paire se trouve, plus ou moins, à soixante acides aminés après le début de la protéine ; la deuxième entre le 20^{ème} et le 30^{ème} acide aminé du domaine transmembranaire du récepteur (figure 4). Le rôle putatif de ces résidus cystéine serait de former des ponts disulfures lors de la dimérisation du récepteur (Diévert *et al.* 2003 et Torii *et al.* 2000).

La structure tridimensionnelle des domaines LRR correspond à une succession alignée et parallèle de plans β reliés par une boucle à une hélice α parallèle au plan β (figure 5). Cette succession de plans et d'hélices alignés forme une structure non globulaire spécialisée dans l'interaction protéine - protéine (Diévert *et al.* 2003). Une mutation dans les zones

conservées en leucine ou dans les boucles perturbent la liaison du ligand parce qu'elle perturbe la succession des plans β et/ou des hélices α . Par exemple, la mutation de la glycine (G) en position 6 du récepteur clavata 1 en acide aspartique (D) donne un phénotype mutant (méristème élargi, voir plus loin). Cette mutation d'un petit acide aminé par un acide aminé chargé désorganise la deuxième boucle du domaine LRR perturbant, dès lors, la liaison du ligand clavata 3. Pour le récepteur bri1, la mutation des acides aminés compris entre deux motifs répétés en leucine perturbe la succession des plans β et des hélices α , et empêche l'interaction avec les brassinostéroïdes (Diévert *et al.* 2003, Torii *et al.* 2000, Becraft 2002 et Hardie 2000).

b) Le domaine S

Le domaine S est présent dans une série de récepteurs tels que SRK de *Brassica* et ARK 1, 2,3 d'*Arabidopsis thaliana*. Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance du soi chez les végétaux, en particulier lors de la pollinisation. Ce motif se retrouve également dans certaines glycoprotéines appartenant à la famille des S-locus glycoprotéines (SLG) chez les Brassicacées et qui sont également impliquées dans la réponse d'incompatibilité pollinique (Hiscock *et al.* 2003, Cock *et al.* 2002, Tichtinsky *et al.* 2003 Takayma *et al.* 2000, Torii 2000 et Becraft 2002).

Le domaine S est caractérisé par douze résidus cystéine, dont dix absolument conservés. La séquence consensus en acides aminés est : CX₅CX₅CX₇CXCX_nCX₇CX_nCX₃CX₃CXCX_nC (figure 6). Le rôle de ces résidus serait de faciliter la formation d'homo- ou d'hétérodimère (Torii *et al.* 2000, Becraft 2002 et Hardie 2000).

c) Le domaine DUF26

Ce domaine, aussi appelé CRR (Cysteine-Rich Repeat), possède la séquence consensus : C-X₈ – C-X₂ – C (figure 7). Cette séquence comporte trois résidus cystéines qui participeraient à la formation de structures tertiaires grâce à la formation de ponts disulfures. Ce type de domaine se retrouve aussi bien dans des protéines solubles que dans des récepteurs membranaires. *Arabidopsis* possède 42 récepteurs contenant ce domaine. La fonction de ce domaine, qui semble être spécifique aux végétaux, n'a pas encore été élucidée (Chen 2001, Becraft 2002, Apweiler *et al.* 2001).

d) Le domaine Crinkly

Ce domaine contient six résidus cystéines et présente une homologie avec le TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) des cellules animales. Un seul représentant de cette classe, CR4 (CRINKLY 4) du maïs, a été identifié à l'heure actuelle. Ce récepteur interviendrait dans le développement de l'épiderme (Becraft *et al.* 1996 et Torii *et al.* 2000).

e) Le domaine PAN

Ce domaine est homologue à un domaine présent sur la famille des plasminogènes et les facteurs de croissance hépatique de *Caenorhabditis elegans*. Ce domaine contient un pattern de résidus hydrophobes et de six cystéines conservées (figure 8) impliqués dans la formation de ponts disulfures (entre C2 et C5 par exemple). Ce type de domaine serait impliqué dans l'interaction protéine - protéine et/ou protéine – oligosaccharide. La fonction de ce domaine est pour l'instant très peu connue (Tordai *et al.* 1999).

hgf_sec_str	EEEEEE EEEEE	EEEE HHHHHHHH	EEEEEE	EEEEEE	EEEE	EEEE	EEEEEE
hgf_human	..NTINGEAKTQIKIDPALK..	ITPKKVNADOCANRNGK...	LPACNAADVOKA...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
hgf_chick	..NPLDQVQGLGKIVNKTLE..	VPLKLLPACACACRNGK...	LSACNAADVOKA...	..TRCCHMSFNSLTHGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
hgf_xenopus	..NAFDDKKAETTRLNKALE..	VPLKMFNTENCACRNGK...	LPACNAADVOKA...	..IRKCHMSFNSMSAGIKDYD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
hgf1_human	..SPLNDQVLRGTQHLLHAVVPG...	WQEDVADAEACACRNGK...	..LDCRAHNVNS...	..SHGQCLPPTQHSHTLRMS...	..GRCDLFQKKD...	..GRCDLFQKKD...	..GRCDLFQKKD...
gfi_xenopus	..SALNDQVRSKGLRVMHNG...	GVRQEQIQTQVCAKQSD...	..LDCRSFVNNR...	..SQCRLPPTQNSANVLLQNR...	..VQDLYQKKD...	..VQDLYQKKD...	..VQDLYQKKD...
hgi_xenopus	..SALNDQVRSKGLRVMHNG...	GVRQEQVQAEIQCAKQSD...	..LDCRSFVNNR...	..SQCRLPPTQNSANVLLQNR...	..VQDLYQKKD...	..VQDLYQKKD...	..VQDLYQKKD...
p1_human	..EPLDDVYVQQASFSVTK...	..QGLGAGSEIANKCDEE...	..PCNAADVOKA...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
p1_wallaby	..EPLDDVYVQQASFSVTK...	..QGLGAGSEIANKCDEE...	..PCNAADVOKA...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
prgb_human	..EPLDDVYVQQASFSVTK...	..QGLGAGSEIANKCDEE...	..PCNAADVOKA...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conN	..NXLLDDVYVQQASFSVTK...	..QGLGAGSEIANKCDEE...	..PCNAADVOKA...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
b0361_9	..PQGLHADAFEYVYEGTM...	..PATMTVDHEDQCLQKAK...	..PRCAVNHFFHFFAY...	..QKQFCCLTEGQLDHSLMRFFA...	..KATYERIK...	..KATYERIK...	..KATYERIK...
c0791_2	..YLGQYELIGAYRADNIE...	..VHTFIPHVQCAKRCBS...	..LDCRAHNVNS...	..SQCRLPPTQNSANVLLQNR...	..VQDLYQKKD...	..VQDLYQKKD...	..VQDLYQKKD...
c16d9_1.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c16d9_1.2	..CTSPGKVIGIVDQ...	..LVSDVAVVNDQACCHQTKY...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conc16d9_1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c29e6_1.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c29e6_1.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c29e6_4.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c30h6_5.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c30h6_5.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c30h6_5.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c30h6_5.4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c30h6_5.5	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c34g6_6.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c34g6_6.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c34g6_6.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c34g6_6.4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c34g6_6.5	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conc34g6_6	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c52b11_1.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
c52b11_1.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conc52b11_1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f32b4_8.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f32b4_8.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f38e11_4.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f38e11_4.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f38e11_4.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f38e11_4.4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conf38e11_4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f41a4_1.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f41a4_1.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f41a4_1.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conf41a4_1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f52b11_3.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f52b11_3.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f52b11_3.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
f52b11_3.4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conf52b11_3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
h42k12_3.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
h42k12_3.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conh42k12_3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
r07a4_4.1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
r07a4_4.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conr07a4_4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
t26c5_2.2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
t26c5_2.3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
fall1_human_1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
fall1_human_2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
fall1_human_3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
fall1_human_4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
kal1_human_1	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
kal1_human_2	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
kal1_human_3	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
kal1_human_4	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
conA	..CQSPMKKPARP...	..LSLNLSDGTFACDMS...	..RQCIDPFNSNGSGVKKFG...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...	..HSDLYEKD...
apple pred	EE	EEEE	HHHHHH	EEEEEE	EEEEEE	EEEE	EEEE
	C1	C2 C3	C4	C5	C6		

Figure 8 : Alignement de plusieurs domaines PAN. Ces alignements permettent de mettre en évidence six résidus cystéines conservés.



Figure 9 : Représentation en 3D d'un domaine sérine / thréonine kinase.

Pro25. LLNLRNVMRFPVLLDWSVGNQTC EQVGS ISICGGNstCLDstPrngYICRCnEGFdGNPY
 Crb Dr PNGDYECKCTRGWTGRTCGNDVDECTLHPKIC--GNaiC--krEksYkCYCtEGFtG---
 EGF10

Pro25. LSaGCq-DVnECITssSTIHRHNISCPKTCrNKvggfYCKCQSGYRLDTTTMSCKRKEFAW
 Crb Dr --VFCDSDVdECIstc-----QInGATChNKinavECVCOpGYEGENCEVPIDECGSNP
 EGF11

Pro25. **TTILLVTTIGFLVILLGVACIQQRMK**

Pro25. HLKDTKLREQFFEQNGGMLTQRLSGPSNVdMKIfTVLgmKKATrGyaEsRILGcGQGT
 Kpro M ISFAWFFVLKRELRPSELWASEKGYKAMTSnPrRvsYRelVKATrKfkVe--LGrGSGT
 I

Pro25. VYKGilP DnsiVAiKKARLgdSsQwedqPInEVLVlpqINHrNvVklLGdCL EteVpLLV
 Kpro M VYKGVLEddrFVAvKK--LerVrQskemVPCaELSVicrINHmNLVriWGFCSEgsHrLLV
 II III IV

Pro25. YEFitNGTLFCHIHGSMINSSLTWEHRLkIAieVAGTLAYLHSSASIFIHHDiKtaNIL
 Kpro M SEYveNGSlArIIIFseGCNII LDWEGRfnIAlgvAKGLAYLHHECLEWvIHCDvKpeNIL
 V Via VIB

Pro25. LDVhltakVaDFGASrLiEm-dkeeLEtmVqGTLGYldPEyYntGLIneKSDVYSfGVVL
 Kpro M LDQafepKitDFGLVvLlNrGgstqNVsHVrGTLGYiaPEwVssLPitaKMDVYSyGVVL
 VII VIII IX

Pro25. mELLsGQkaLCrKRQSSKH----LVsYfat--atkenrldEliggevMnEDNLKkElc
 Kpro M lELLtGTrvSEIVGGTdeVHSMRLKLVrMlsakLEgeeQswiDgYldsklNrPVNYVqAr
 X

Pro25. eAAriAaeCItngRg-RPFMkevaakLEALRVEKTKHKWSDQYPEENEHLIGGHILSAQG
 Kpro M tLIklAvsCLeedRsKRPI MehavqtlLSADD
 XI

Figure 10 : Représentation des onze sous-domaines conservés du domaine sérine / thréonine kinase conservé du récepteur Wak 1(Pro25).

	I	II	VIB
LePRK1	AEILGSGVFGS ty KAALSrGRVMV V KRFR	-----	APHG h LKSSNVLLNES
LePRK2	AEVLGSGVFGS ty KAALSTGPVMV V KRFR	-----	SPHG h LKSSNVLLTEN
PRK1	AEVLGSONLGS ty KALLMDGQAV V KRFR	-----	LPHG h LKSSNVLLDKY
CLV1	ENIIGKGAGIVYRGSMNPNDVA I KRLV	-----	ILHRDVKSSNVLLDSD
BRI1	DSLIGSGGF GD VYKAILKDGSAVA I KKLI	-----	IIHRDMKSSNVLLDEN
ERECTA	KYIIGHGASSTVYKCVLKNCKPVA I KRLY	-----	IIHRDVKSSNVLLDKD
Xa21	TNLLGSGSFGSVYKGLNIQDHVA V KVLK	-----	VVHCDIKSSNVLLDSD
SERK	STILGSGGF GV YKGLADGSLVA V KRLK	-----	IIHRDVKAANILLDEE
TMK1	DNILGSGGF GV YKGLHDGTKIA V KRME	-----	FIHRDLKPSNILLGDD
RLK5	KNVIGFGSG GV YKVELRGGEVVA V KKLN	-----	IVHRDVKSSNVLLDSD
ARK1	DNKLQGGFG IV YKGRLLDGKEIA V KRLS	-----	IIHRDLKASNVLDDKN
CR4	DSQVGKGSFSCV FG ILRDGTVV V KRAI	-----	VIHRDIKSSNVLLDED
	* *	*	* *

Figure 11 : Alignement de plusieurs domaines sérine / thréonine kinase de plantes au niveau des domaines sérine/thréonine kinase conservé I, II et VIB. Les acides aminés conservés sont mis en gras ; l'astérisque désigne l'emplacement d'acides aminés conservés du domaine ; le cercle représente des substitutions observées chez des récepteurs possédant un domaine S.

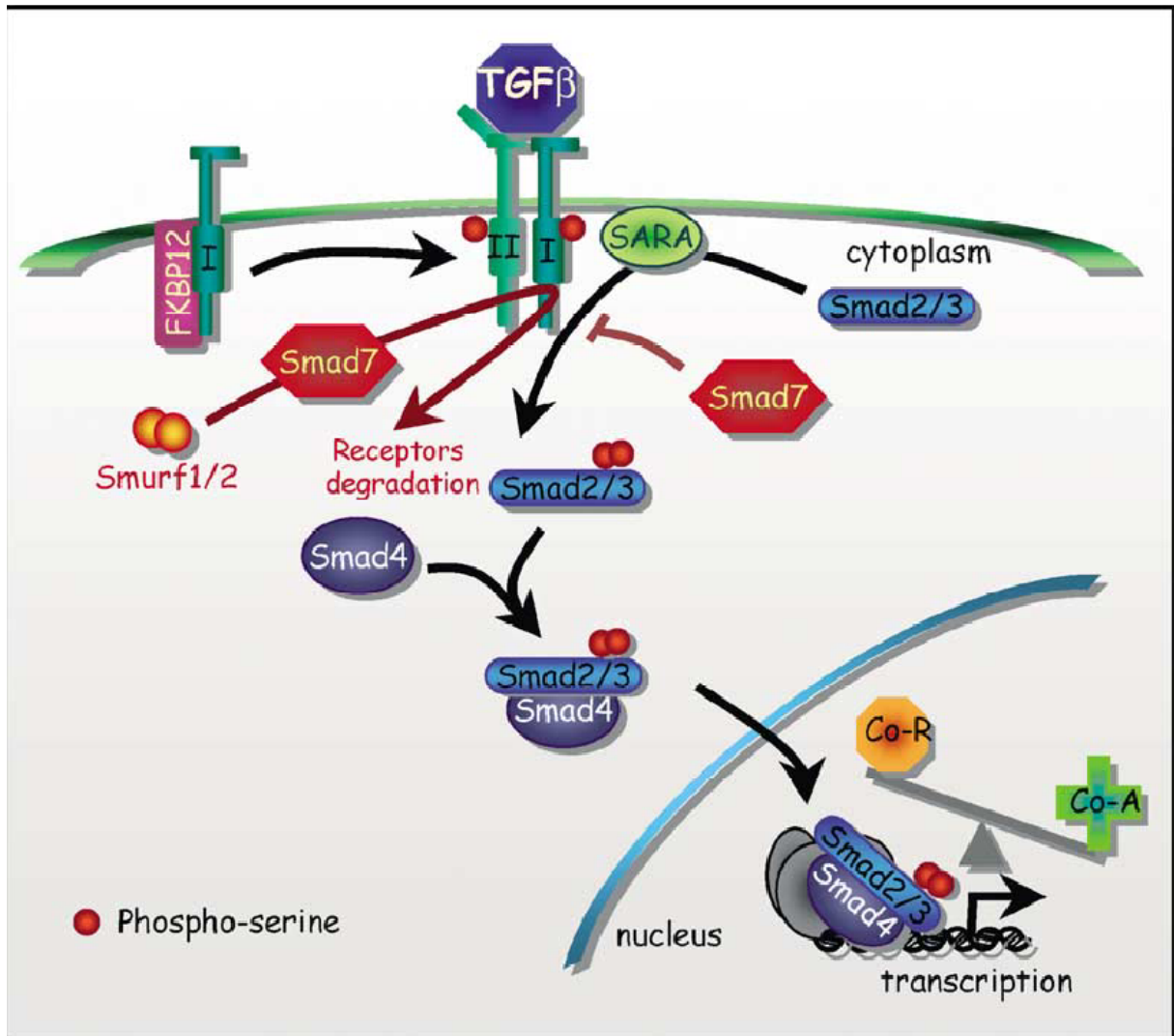


Figure 12 : Voie de transduction du signal simplifié du récepteur sérine / thréonine kinase TGFβ des cellules animales. TGFβ se fixe sur le récepteur TGFβII qui recrute TGFβI et le phosphoryle via une activité kinase intrinsèque. En absence de ligand, l'activité kinase de TGFβ II est inhibée par la liaison de FKBP12 à la région GS du récepteur. Une fois l'hétérodimère formé, TGFβI recrute et phosphoryle une R-Smad. Le complexe R-Smad est amené en membrane par le complexe SARA, un complexe qui régule la localisation subcellulaire des R-Smad. R-Smad phosphorylé s'associe à Smad 4 et migre vers le noyau. Dans le noyau, il s'associera à des co-activateurs ou des co-répresseurs transcriptionnels. Selon le complexe formé, il y activera ou inhibera des gènes cibles.

f) Le domaine lectine

Le motif lectine est homologue à la lectine présente chez les légumineuses. Il existe 38 récepteurs chez *Arabidopsis* qui possèdent ce type de domaine, par un exemple LecRK1. La fonction biologique de ce domaine serait de fixer des oligosaccharides exogènes et/ ou endogènes provenant de la dégradation de la paroi par un pathogène et d'initier la réponse de défense. Des analyses structurales montrent que les récepteurs LecRK ne sont pas capables de fixer des monosaccharides comme les lectines des légumineuses, mais des sucres beaucoup plus complexes. Excepté le cas de LecRK1, aucune fonction physiologique précise n'a été attribuée à cette classe de récepteurs (Torii *et al.* 2000, Becraft 2002, Chen 2001, Hervé *et al.* 1999 et Hardie 2000, Riou *et al.* 2002).

g) Le domaine Wak

Le domaine Wak comprend une région conservée ayant une homologie avec les domaines EGF des cellules animales présentant un consensus de répétition de résidus cystéines typiques. En plus des domaines EGF répétés, les récepteurs Wak possèdent d'autres sous-domaines typiques des protéines de la matrice extracellulaire des cellules animales. Le domaine extracellulaire Wak s'est révélé être associé physiquement à la paroi cellulaire (Torii *et al.* 2000, Becraft 2002 et Hardie 2000). Les récepteurs Wak seront détaillés au point B.

Classification par domaines kinases

a) Les récepteurs sérine/thréonine kinase

Le domaine kinase le plus abondant chez *Arabidopsis* est le domaine sérine/thréonine kinase (figure 9). Ce domaine est organisé en onze sous-domaines formant le domaine catalytique de la kinase (figure 10). Ces domaines sont assez bien conservés entre les règnes (Diévert *et al.* 2003). Chez la cellule végétale, ce sont les domaines VIb et VIII qui sont les plus remarquablement conservés. Ils correspondent à une signature spécifique des récepteurs sérine/thréonine kinase (VIb) et à une boucle d'activation de la kinase (figure 11) (Torii *et al.* 2000).

Un des représentants de la famille des récepteurs sérine/thréonine kinase chez les cellules animales est la sous famille des récepteurs TGF β (Becraft 2002, Schiller *et al.* 2004 et Cock 2002). Cette sous-famille de récepteurs intervient dans des processus tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose,... Une cytokine de la super-famille TGF β , (TGF β ou BMP (Bone morphogenic factor)), se fixe sur le récepteur TGF β II. TGF β II recrute ensuite TGF β I et le phosphoryle via une activité kinase intrinsèque sur des résidus sérines et thréonines. En absence de ligand, l'activité kinase de TGF β II est inhibée par la liaison de FKBP12 à la région GS du récepteur. Par contre, une fois l'hétérodimère formé, TGF β I recrute et phosphoryle une protéine R-Smad (Receptor Associated Smads avec Smad 1, 2, 3, 5 ou 8). Le complexe R-Smad est amené en membrane par le complexe SARA, un complexe régulant la localisation subcellulaire des R-Smad. Une fois phosphorylé, R-Smad s'associe à Smad 4 et migre vers le noyau. Dans le noyau, il s'associera à des co-activateurs ou à des co-répresseurs transcriptionnels. Selon le complexe formé, il activera ou inhibera des gènes cibles (Torii 2000, Schiller *et al.* 2004) (figure 12). Bien que cette voie de transduction du signal n'existe pas chez la cellule végétale, on retrouve dans sa logique de fonctionnement des similitudes avec des récepteurs de plante.

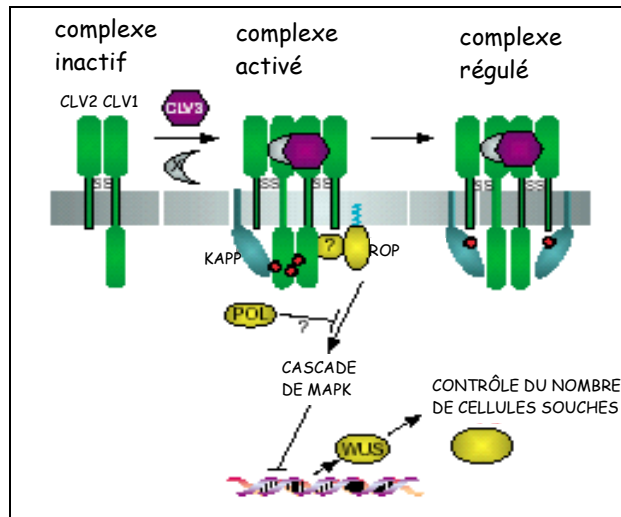


Figure 13 : Voie de transduction du signal du récepteur clavata 1. Lorsqu'il y a prolifération des cellules souches, clavata 3 se lie à clavata 1 qui s'associe ensuite à clavata 2 pour former un hétérocomplexe. Cet hétérocomplexe se dimérise et recrute deux protéines : Rop et KAPP. Après dimérisation, le domaine kinase de clavata 1 est phosphorylé. Le récepteur phosphoryle ensuite la protéine KAPP et active la voie des MAP kinase via la protéine ROP. Cette cascade réprime la transcription du gène Wuschel (WUS) qui contrôle le nombre de cellules souches (Tichtinsky et al. 2003).

Très peu de récepteurs à sérine/thréonine kinase de plantes sont actuellement caractérisés. Les récepteurs Clavata 1, Bri1, SRK, FL22 sont les récepteurs de plantes les mieux caractérisés et dont une partie de la voie de transduction du signal est connue. Il faut noter que ces récepteurs n'ont pas été découverts grâce à l'effort de séquençage mais par l'analyse de mutants.

♦ Clavata, un récepteur intervenant dans l'organogenèse

Durant le développement post-embryonnaire, la formation de nouveaux organes est contrôlée par le méristème apical (SAM). Ce dernier contrôle l'équilibre entre prolifération et différenciation des cellules souches. Des mutants d'*Arabidopsis* nommés CLAVATA (CLV) présentant une hyper-accumulation de cellules souches dans la zone centrale de l'apex de la tige ont été identifiés. Les méristèmes floraux et végétatifs de ces plantes s'élargissent, perturbant ainsi l'organogenèse (Lindsey *et al.* 2002).

L'analyse fonctionnelle de ces mutants a permis de mettre en évidence trois gènes dont la mutation donne le même phénotype : *Clavata 1*, *Clavata 2*, *Clavata 3*. *Clavata 1* code pour un récepteur sérine/thréonine kinase avec domaine extracellulaire LRR ; *Clavata 2* code, quant à lui, également pour un récepteur avec un domaine extracellulaire LRR mais ne possédant pas de domaine kinase intracellulaire. *Clavata 3* ne code pas pour un récepteur mais pour un polypeptide sécrété par certaines cellules du méristème (Haecker *et al.* 2001, Lease *et al.* 1998, Lindsey *et al.* 2002, Tichtinsky *et al.* 2003, Becraft 2002).

Lorsqu'il y a prolifération des cellules souches, Clavata 3 se lie à Clavata 1 qui s'associe à Clavata 2 pour former un hétérocomplexe. Cet hétérocomplexe dimérise et s'associe à deux protéines : Rop (Rho-GTPase-like protein) et KAPP (Kinase-Associated protein phosphatase). Après dimérisation, on observe une autophosphorylation entre les domaines kinases de Clavata 1 suivi par la phosphorylation de KAPP et l'activation d'une cascade de MAP kinase par Rop. Cette cascade réprime la transcription du gène *Wuschel*

(WUS), un gène homéotique contrôlant le nombre de cellules souches et activant la transcription du ligand Clavata 3. L'activité du récepteur Clavata est régulée négativement par la protéine POLTERGEIST (POL) qui est, elle-même, régulée par KAPP (figure 13). C'est le rapport entre l'activité de Wus et la production de Clavata 3 qui permet de contrôler le nombre de cellules souches dans le méristème apical (Haecker *et al.* 2001, Lease *et al.* 1998, Lindsey *et al.* 2002, Tichtinsky *et al.* 2003, Becraft 2002).

♦ BRI1, un récepteur intervenant dans la perception des brassinostéroïdes

Les brassinostéroïdes sont des hormones stéroïdiennes végétales impliquées dans la régulation de la croissance et l'élongation cellulaire (Clouse 2002, Yin *et al.* 2002 et Becraft 2002).

C'est lors d'un criblage de mutants insensibles à l'application de brassinostéroïdes exogènes que le récepteur *Bri1* a été identifié (Becraft 2002). Le récepteur BRI1 est un récepteur sérine/thréonine kinase avec un domaine extracellulaire de type LRR (Yin *et al.* 2002). Celui-ci est composé de 25 répétitions LRR interrompues par une zone de 70 acides aminés qui pourraient être impliqués dans la liaison du ligand. Une mutation dans cette zone donne, en effet, un phénotype mutant insensible aux brassinostéroïdes (Torii *et al.* 2000).

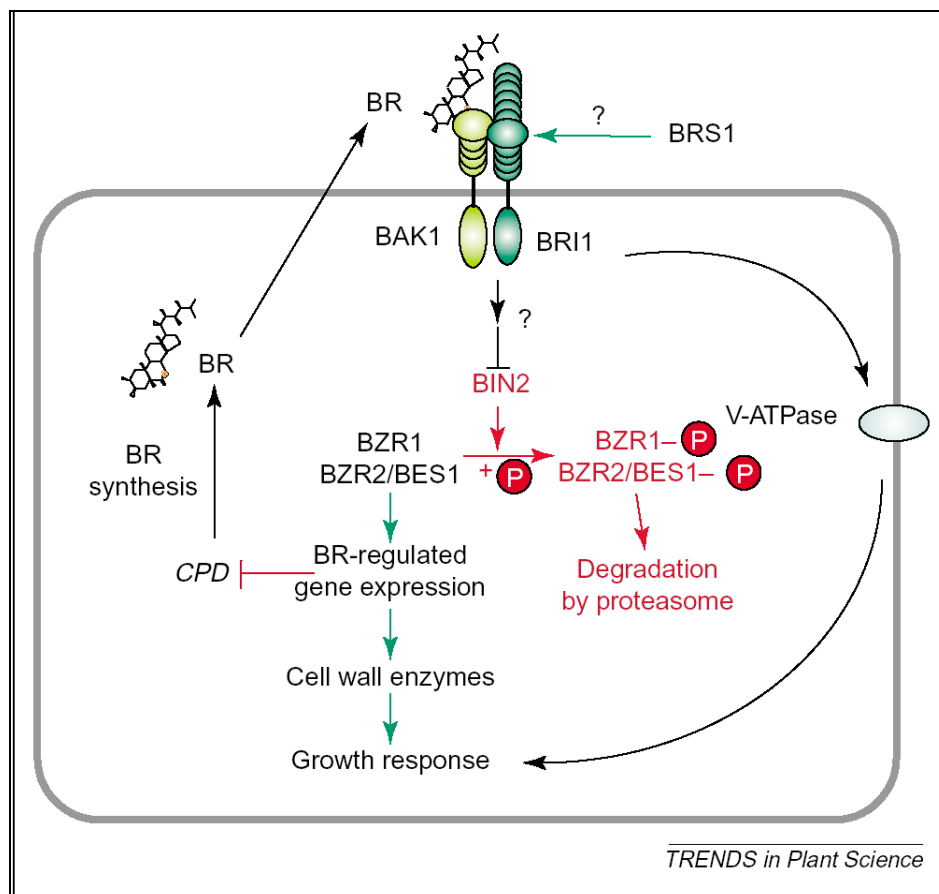


Figure 14 : Voie de transduction du signal de bri1. Lorsqu'il n'y a pas de brassinostéroïde, BIN2 (BR-insensitive 2 kinase) phosphoryle BES2 (BRI-EMS-suppressor 2) et BZR1 (brassinazole-resistant 1). Une fois phosphorylé, ces deux facteurs de transcription sont dégradés par le protéasome. La liaison d'un brassinostéroïde, peut-être associé à une protéine, active l'hétérodimérisation de BRI1 avec BAK1 (BRI1-associated receptor kinase). Après autophosphorylation, le complexe BRI1/BAK1 inactive BIN2 probablement via un ou plusieurs intermédiaires non identifiés. Une fois BIN2 inactivé, les facteurs de transcription BES2 et BZR1 ne sont plus dégradés et peuvent dès lors migrer vers le noyau. Une fois dans le noyau, ils activeront les gènes de la réponse aux brassinostéroïdes.

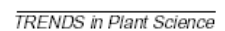


Figure 15 : Réponse de l'incompatibilité pollinique. En absence de grain de pollen, le récepteur SRK est présent sous forme monomérique et est maintenu à l'état inactif par l'interaction avec une thioredoxine-H-like (THL) qui empêche l'autophosphorylation du domaine kinase. Lorsqu'il y a un grain de pollen, et qu'il n'est pas compatible (génétiquement trop proche), le ligand SCR se lie et induit l'homodimérisation de SRK ou la formation d'un hétérodimère avec SLG. Après autophosphorylation, le récepteur phosphoryle la protéine ARC1 (armadillo-repeat-containing 1) et KAPP. ARC1 initie la cascade cytosolique qui mènera au rejet du grain de pollen. ARC1 phosphorylé agit comme une E3-ubiquitine ligase qui greffe des ubiquitines sur des facteurs de croissance du grain de pollen qui seront dégradés par le signalosome COP9.

Lorsqu'il n'y a pas de brassinostéroïdes, la protéine BIN2 (BR-insensitive 2 kinase) phosphoryle les protéines BES2 (BRI-EMS-suppressor 2) et BZR1 (brassinazole-resistant 1). Une fois phosphorylés, ces deux facteurs de transcription sont dégradés par le protéasome. La liaison au récepteur BRI1 d'un brassinostéroïde, peut-être associé à une protéine, active l'hétérodimérisation de BRI1 avec BAK1 (BRI1-Associated Receptor Kinase). Après autophosphorylation, le complexe BRI/BAK inactive BIN2 probablement via un ou plusieurs intermédiaires non-identifiés. Une fois BIN2 inactivé, les facteurs de transcription BES2 et BZR1 ne sont plus dégradés et peuvent dès lors migrer vers le noyau. Une fois dans le noyau, ils activeront les gènes de la réponse aux brassinostéroïdes (figure 14) (Becraft 2002, Lease *et al.* 1998, Clouse 2002, Yin *et al.* 2002). Parmi ces gènes, on retrouve des gènes impliqués dans la division cellulaire comme *CycD3*, une cycline spécifique de cette voie, ou dans l'élongation cellulaire comme *TCH4*, une xyloglucane endotransglycosyltransférase (Hu *et al.* 2000). D'autres gènes sont, quant à eux, réprimés en présence de brassinostéroïdes ; c'est le cas du gène codant pour le facteur de transcription *BRH1* (Molnar *et al.* 2002).

♦ SRK, un récepteur impliqué dans la reconnaissance du pollen

Les plantes ont mis au point des mécanismes anatomiques et moléculaires pour éviter l'autofécondation et promouvoir l'allogamie. Dans ce dernier cas, les cellules du stigmate expriment à leur surface les protéines SRK (S-locus receptor kinase) et SLG (S-locus glycoprotéine). Le grain de pollen, quant à lui, exprime à sa surface la protéine SCR (locus S riche en cystéines). C'est l'interaction entre ces différentes protéines qui déterminera s'il y a compatibilité menant dès lors à une fertilisation, ou incompatibilité empêchant le tube pollinique de se développer (Hiscock *et al.* 2003, Cock *et al.* 2002, Tichtinsky *et al.* 2003, Takayma *et al.* 2000, Torii 2000 et Becraft 2002).

En absence de grain de pollen, le récepteur SRK est présent sous forme monomérique et est maintenu à l'état inactif par l'interaction avec une thiorédoxine-H-like (THL) qui empêche l'autophosphorylation du domaine kinase (Hiscock *et al.* 2003, Cock *et al.* 2002, Tichtinsky *et al.* 2003 et Becraft 2002). Dans cet état, SRK n'est pas lié à SLG suggérant que SLG est recruté pour l'activation de SRK. Lorsqu'il y a un grain de pollen et qu'il n'est pas compatible (parce que génétiquement trop proche), le ligand SCR du grain de pollen se lie à SRK et induit l'homodimérisation de SRK ou la formation d'un hétérodimère avec SLG. Après autophosphorylation, le récepteur phosphoryle la protéine ARC1 (armadillo-repeat-containing 1) et la protéine KAPP. ARC1 initie la cascade cytosolique qui mènera au rejet du grain de pollen. ARC1 phosphorylé joue le rôle de E3-ubiquitine ligase et greffe des ubiquitines sur des facteurs de croissance du grain de pollen qui, une fois ubiquitinylés, sont dégradés par le signalosome COP9 (Hiscock *et al.* 2003, Cock *et al.* 2002, Tichtinsky *et al.* 2003). La protéine KAPP déphosphoryle probablement SRK, et par conséquent, régulerait l'activité du complexe SRK (figure 15). Lors de cette réponse d'incompatibilité, les gènes de la maturation du grain pollen à la surface du stigmate sont également réprimés. Cette réponse est accompagnée par une augmentation des ions calcium dans le cytosol entraînant une désorganisation du cytosquelette empêchant la polarisation normale du grain de pollen. Parallèlement, l'inhibition d'un type d'aquaporines empêche l'hydratation du grain de pollen bloquant dès lors sa germination (Cock 2000).

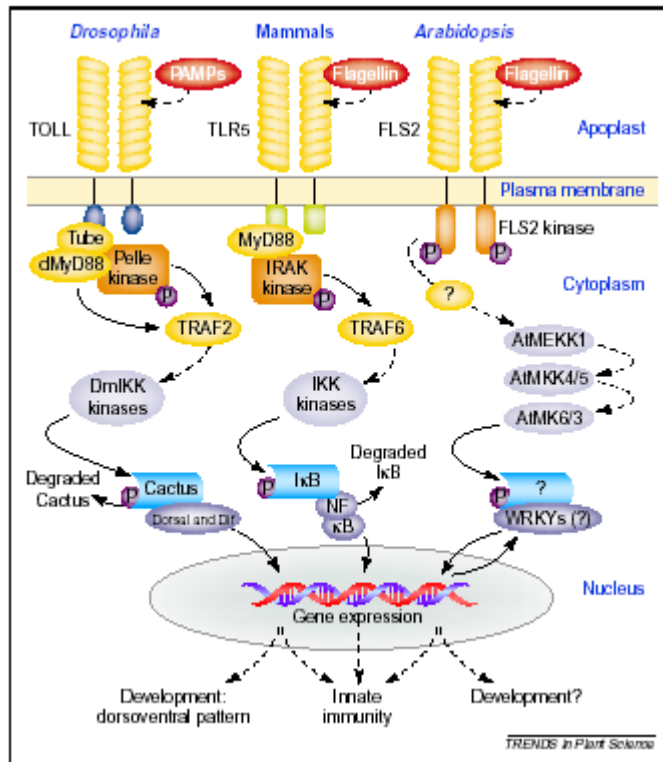


Figure 16 : Voie de transduction du signal du récepteur FLS2 homologue aux récepteurs Toll de la drosophile et au récepteur TLR5 des cellules de mammifères. Dans le cas du récepteur FLS2, La liaison de la flagelline au domaine LRR mène à la dimérisation et à l'activation de la kinase. L'activation de FLS2 induit une cascade de MAP kinase. Cette cascade inclut AtMEKK1, AtMAPKK4/AtMAKK5 et AtMAPK3/AtMAPK6, des analogues de la voie des MAPK animales. Cette cascade active l'expression des gènes de la réponse aux pathogènes endéans les 30 minutes. Dans le cas des récepteurs TOLL son activation induit au stade larvaire le développement dorsoventral et. Les récepteurs TOLL et TLR5 induisent l'immunité non spécifique.

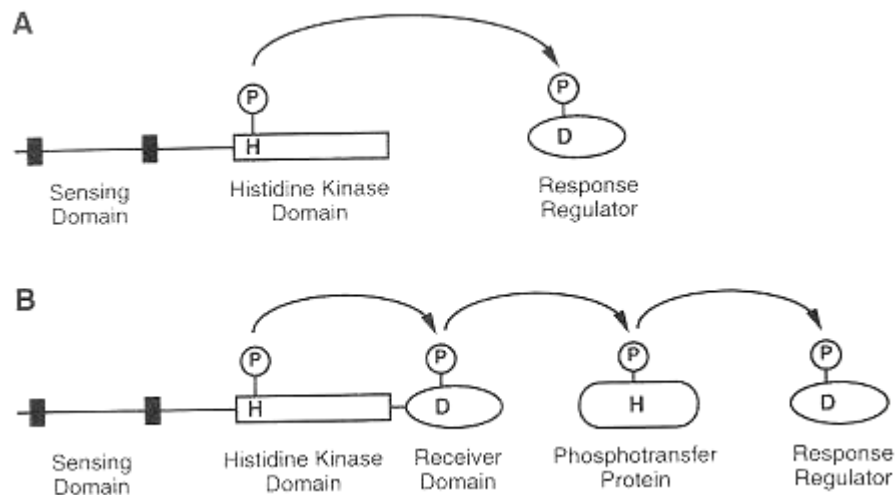


Figure 17 : Représentation schématique du système à deux composantes.

(A), un senseur à histidine kinase et le régulateur de réponse montrant le transfert de phosphate entre un résidu histidine (H) du senseur vers un résidu aspartate (D) du régulateur de réponse.

♦ FLS2, un récepteur impliqué dans la réponse contre les pathogènes

La reconnaissance d'un pathogène potentiel est essentielle à la plante pour se défendre contre celui-ci. Bien qu'il existe un grand nombre de récepteurs (membranaire et cytosolique) connus régissant l'interaction d'un pathogène donné avec une plante donnée, un récepteur généraliste a été récemment identifié chez les végétaux (Morris *et al.* 2003).

Ce récepteur, nommé FLS2, est un récepteur liant la flagelline des bactéries gram -. La flagelline est le constituant unique du filament, une des trois parties du flagelle. Chez les animaux, la flagelline est fortement antigénique et constitue ce qu'on appelle l'antigène H. Le récepteur FLS2 contient un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine extracellulaire LRR qui interagit avec un domaine conservé de la flagelline de plusieurs bactéries gram- (Tichtinsky *et al.* 2003, Montesano *et al.* 2003, Cock *et al.* 2002 et Torii 2000).

Le récepteur FLS2 d'*Arabidopsis* a une structure similaire au récepteur Toll like (TLR) des cellules animales. Les récepteurs TLR5 sont impliqués dans la reconnaissance de caractères communs de nombreux pathogènes, dont la flagelline, et participerait à l'activation d'une réponse de défense non spécifique. Chez la drosophile, le récepteur TOLL reconnaît des PAMPs (pathogene associated molecular pattern) et induit la réponse inflammatoire. Il est aussi impliqué dans le développement de l'axe dorsoventral durant le développement larvaire (Gomez *et al.* 2002, Jones *et al.* 2004 et Morris *et al.* 2003).

La liaison de la flagelline au domaine LRR de FLS2 induit la dimérisation et l'activation du domaine kinase par autophosphorylation. L'activation de FLS2 induit une cascade de MAP kinase probablement via la protéine AtPhos43. Cette cascade inclut AtMEKK1, AtMAPKK/AtMAKK5 et AtMAPK3/AtMAPK6, des analogues de la voie des MAPK animales. La détection de la flagelline active ainsi l'expression des gènes de la réponse aux pathogènes endéans les 30 minutes entre autres, via l'intermédiaire du facteur de transcription de type WRKY spécifique du monde végétal. KAPP interagit également avec FLS2, probablement pour réguler son activité (figure 16) (Tichtinsky *et al.* 2003).

b) Le domaine histidine kinase

Le deuxième domaine kinase le plus représenté chez les végétaux est le domaine histidine kinase du système à deux composants. Ce système est typique des bactéries et des levures. Un récepteur histidine kinase est composé de deux éléments : le senseur et le régulateur de réponse. Le senseur contient le domaine de liaison du ligand, un ou plusieurs domaines transmembranaires et le domaine histidine kinase. Le régulateur de réponse est une protéine qui sera activée ou inactivée, selon le contexte, par le senseur et qui régulera une réponse cellulaire. Le senseur et le régulateur de réponse peuvent parfois être associés dans une même protéine (Schaller 2000).

Le mode de fonctionnement des systèmes à deux composants est relativement simple. Un ligand se fixe au senseur qui peut se trouver sous forme dimérisée ou qui dimérise en présence du ligand. Après autophosphorylation des résidus histidines conservées du domaine kinase, il y a un transfert de ce phosphate vers un résidu aspartate conservé présent sur le régulateur de réponse. Ce dernier activera, ou inactivera, différents effecteurs en aval. La cascade comprend parfois des protéines supplémentaires qui relaient le résidu phosphate vers un ou plusieurs régulateurs finaux (figure 17) (Schaller 2000, Urao *et al.* 2000).

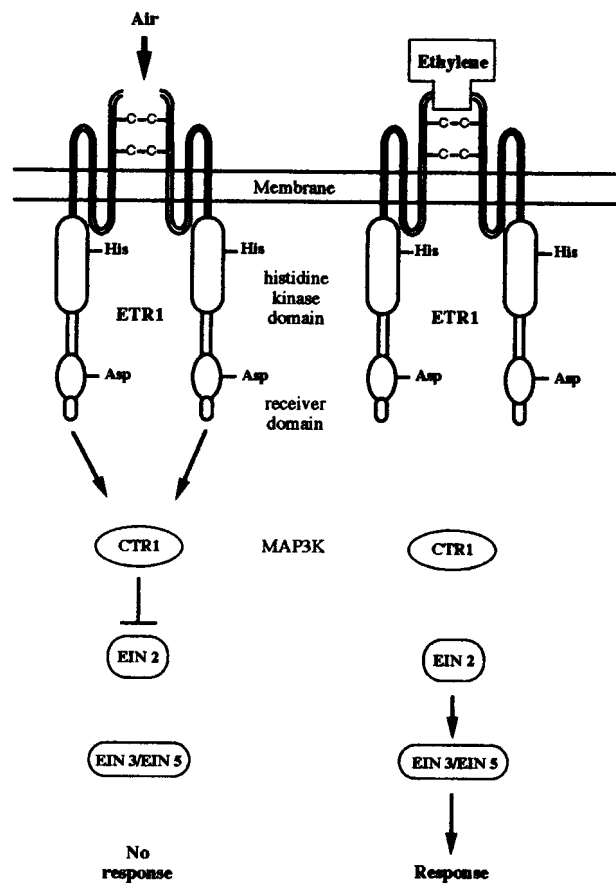
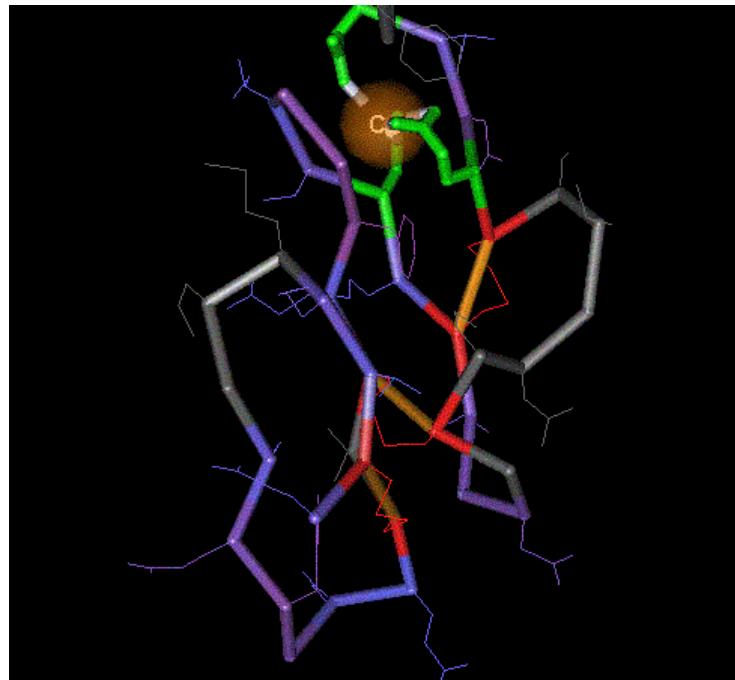


Figure 18 : Voie de transduction du signal de l'éthylène. Le récepteur ETR1 est actif en absence d'éthylène. Il forme un homodimère lié par ponts disulfures et est associé à des ions cuivre. ETR1 active constitutivement CTR1, une Raf-like sérine/thréonine kinase qui inhibe la réponse à l'éthylène par inactivation des effecteurs en aval EIN2, EIN3, EIN5 et EIN6. En présence d'éthylène, le récepteur ETR1 est inactivé, CTR1 n'est plus inhibé et peut donc promouvoir la transcription des gènes sensibles à l'éthylène.

A.



B.

		970	980	990	1000	1010	1020	
	******	
1EMN	42	vDTDEC	svg~np	Cg~~NGTCKNVIGGF	ECtCEE~GFEPgp~mMT	C~~~~~	~~~~~	82
1FAX_L	41	fTRKLC	sldngdC	~~~DQFCHEEQASVVC	sCAR~GYTLadngKAC	Iptgpypcgkqtler	~~~~~	96
gi 17433136	961	gCVGR	Ces~~np	Cl~nNGTCTIERYDGYSC	dCRWsAFKG~~~~PIC	adeigvnlrsssiir	~~~~~	1013
gi 7494914	239	eDMDE	Cemgidn	CpneQPDCLNTPGSFLC	lCFE~YDEAq~~~QKC	Knskaappsapipvd	~~~~~	294
Consensus	1	~DIDE	Casg~np	Cq~nGGTCVNTVGSYRC	sCPP~GYTG~~~~RN	C~~~~~	~~~~~	38

Figure 19 : **A.** Représentation en 3D de la structure d'un domaine EGF- Ca^{++} . **B.** Alignement de divers domaines EGF montrant les six résidus cystéine (en jaune) typiques des domaines EGF.

Chez les végétaux, les récepteurs à deux composants les mieux caractérisés sont impliqués dans la perception de l'éthylène, des cytokinines et de la lumière (Schaller 2000, Urao *et al.* 2000, Kakimoto 1998, Howell *et al.* 2003, Guo *et al.* 2004).

♦ Les récepteurs à l'éthylène

Une famille de cinq récepteurs de l'éthylène (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 et EIN4) a été découverte chez *Arabidopsis* (Schaller 2000). L'éthylène est une hormone végétale qui intervient dans la germination, l'abscission, la sénescence des organes, le mûrissement du fruit et la réponse aux pathogènes (Urao *et al.* 2000, Schaller 2002). Ces récepteurs ont été identifiés grâce à l'obtention de mutants présentant la réponse triple (Buer *et al.* 2003).

Les récepteurs ETR1 et ERS1, des récepteurs de type I, possèdent un domaine kinase fonctionnel. Les récepteurs ETR2, ERS2, EIN4, des récepteurs de type II, possèdent un domaine kinase ayant perdu leur activité (Urao *et al.* 2000, Guo *et al.* 2004, Schaller 2002). Le récepteur ETR1, le mieux caractérisé, est un récepteur actif en absence d'éthylène. Il forme un homodimère lié par ponts disulfures et est associé à des ions cuivre (Urao *et al.* 2000, Guo *et al.* 2004). En absence d'éthylène, ETR1 active CTR1, une Raf-like sérine/thréonine kinase qui inhibe la réponse à l'éthylène par inactivation des effecteurs en aval EIN2, EIN3, EIN5 et EIN6. CTR1 est homologue à une MAPKKK suggérant que la voie de l'éthylène activerait une voie de MAPK (Guo *et al.* 2004). En présence d'éthylène, le récepteur ETR1 est inactivé. Une fois le récepteur inactivé, CTR1 n'est plus inhibé et peut promouvoir la transcription des gènes sensibles à l'éthylène (figure 18) (Urao *et al.* 2000, Guo *et al.* 2004, Schaller 2002).

B. Les récepteurs Waks

1. Structure

Lors de l'analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana*, cinq gènes Wak ont été identifiés. Ils sont localisés sur le chromosome 1 et forment un groupe de gènes occupant un espace de 30 kb (He *et al.* 1996 et Verica *et al.* 2002). Cette famille de gènes a été récemment agrandie par 22 nouveaux membres, les Wak-Like protéines (Wakl), répartis sur l'ensemble du génome (Verica *et al.* 2002).

Les gènes *Wak*, et certaines *Wakl*, codent pour des récepteurs kinases transmembranaires (Verica *et al.* 2002). Ces protéines possèdent un seul domaine transmembranaire, un domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire et un domaine extracellulaire variable. Le domaine kinase des cinq isoformes (*Wakl-5*) est relativement bien conservé (86 % d'homologie). Le domaine extracellulaire est, quant à lui, assez variable entre les cinq isoformes (40-64 % d'homologie) mais toutes possèdent deux répétitions EGF-like près du domaine transmembranaire (Lally *et al.* 2001).

Les motifs EGF contiennent typiquement six résidus cystéines conservés pouvant réaliser trois ponts disulfures (figure 19). Alors que les espaces entre les cystéines sont relativement bien conservés chez eucaryotes, par contre les autres acides aminés se trouvant entre les résidus cystéines sont hautement divergents (Kohorn 2001). Le domaine extracellulaire des protéines Wak contient deux types de domaine EGF : un domaine EGF-Ca

wak (wall associated kinase)

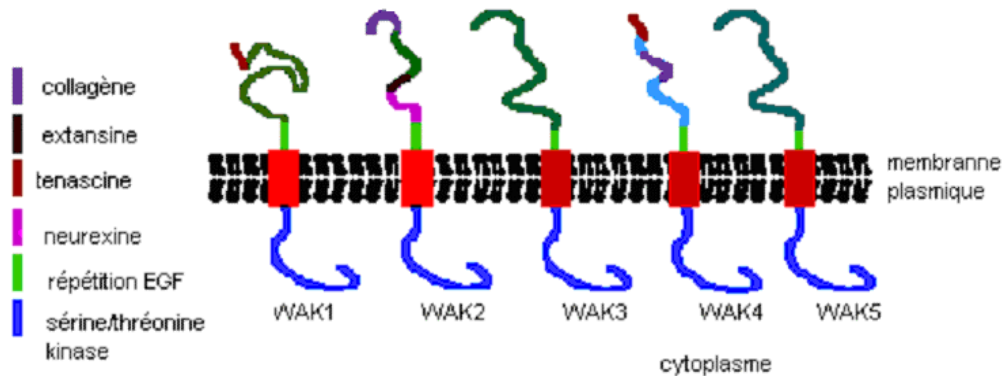


Figure 20 : Représentation schématique des récepteurs WAK1-5. Les domaines sérine/thréonine kinase cytosoliques sont représentés en bleu. Les domaines EGF-like des domaines extracellulaires sont symbolisés par les traits verts. Des domaines présentant une homologie avec le collagène (en mauve), l'extansine (en noir), la tenascine (en bordeaux) et la neurexine (en violet) de la matrice extracellulaire des cellules animales font parti domaines extracellulaires des protéines wak.

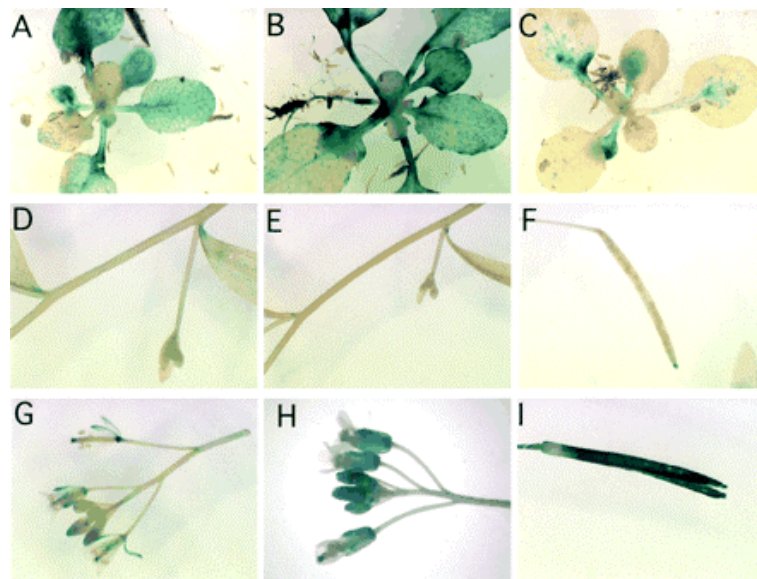


Figure 21 : Localisation de l'activité GUS sous le contrôle des promoteurs wak 1,2 ou 3 chez des plants d'*Arabidopsis thaliana*. Les photos A-C représentent de jeunes plantes de 14 jours. Les promoteurs wak1 (A) et wak2 (B) sont actifs au niveau des tissus vasculaires de la feuille et du pétiole. Le promoteur wak3 (C) s'exprime uniquement au niveau du pétiole. Les photos D et E montrent respectivement l'activité des promoteurs Wak1 et wak2 au niveau de la jonction des inflorescences. Les photos G et H représentent le profil d'expression du promoteur wak1 (G) et wak2 (H) au niveau des fleurs. Wak1 s'exprime au niveau des sépales et au niveau du stigmate avant l'ouverture des fleurs ; tandis que wak2 est actif à la base des fleurs. Les figures F et I montrent l'activité du promoteur wak1 au niveau de la silique. Lorsque la silique est verte, on détecte l'activité GUS uniquement au niveau de la pointe de la silique. A un stade de développement plus avancé de la silique, l'activité de GUS est détectée dans l'ensemble des tissus de la silique (Wagner et al 2001).

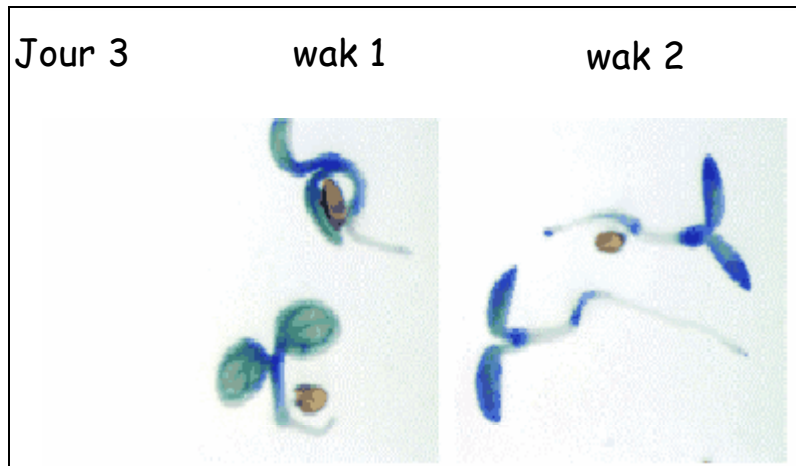


Figure 22 : Activité des promoteurs wak1 et wak2 au troisième jour de développement du cotylédon. Wak1 est exprimé au niveau des tissus vasculaires tandis que wak 2 est exprimé dans le reste du cotylédon (Wagner et al 2001).

liant le Ca^{++} et un domaine EGF ne liant pas le Ca^{++} . Ces deux domaines se distinguent aussi par leur séquence consensus. Chez les métazoaires, les motifs EGF sont présents dans une série de protéines de membrane, de protéines sécrétées et dans des hormones polypeptidiques. Dans tous les exemples connus, ces motifs sont impliqués dans des interactions protéine – protéine (Kohorn, 2001).

Les protéines Wak possèdent aussi, selon l'isoforme, plusieurs sous-domaines extracellulaires partageant une homologie avec des protéines de la matrice extracellulaire des cellules de mammifères telles que le collagène, la neurexine ou la tenascine (figure 20) (Wagner *et al.* 2001 ; Lally *et al.* 2001 ; Becraft 2003). Le rôle de ces sous-domaines dans la fonction du récepteur kinase n'est pas encore élucidée.

2. Expression de Wak

Les profils d'expression des protéines Wak ont été déterminés à partir de plantes transformées avec une construction contenant le gène rapporteur *GUS* (β -glucuronidase) mis sous le contrôle des différents promoteurs *Wak*. Les observations histologiques montrent que les protéines Wak sont exprimées à la jonction des organes, dans le méristème apical des tiges et des racines, dans les feuilles, les siliques et dans les fleurs (figure 21). Les profils d'expression des différentes isoformes se recouvrent assez fortement, ce qui pourrait suggérer une interaction physique et/ou physiologique entre elles (He *et al.* 1999, Wagner *et al.* 2001).

Wak 1 et *Wak 2* sont les isoformes les plus abondantes et sont exprimées dès les premières étapes du développement. On les retrouve essentiellement à la jonction des organes, dans le méristème apical des racines et des tiges, dans les feuilles et les sépales. Les profils d'expression spatio-temporelle de certaines isoformes sont parfois différents. *Wak 1* et *Wak 2* s'expriment parfois à des moments différents du développement, mais peuvent aussi s'exprimer au même moment dans le même organe à des endroits différents. Par exemple,

chez *Arabidopsis* au troisième jour de développement du cotylédon, *Wak* 1 est exprimé dans les tissus vasculaires de la feuille, tandis que *Wak* 2 est exprimé dans le reste de la feuille (figure 22) (He *et al.* 1999 Wagner *et al.* 2001).

Le profil d'expression de l'isoforme *Wak* 3 est associé à l'infection de la plante par un pathogène. La protéine s'accumule au niveau des micro-lésions laissées lors de l'attaque par un pathogène (He *et al.* 1999, Wagner *et al.* 2001).

Wak 4 est exclusivement exprimé dans les siliques, tandis que *Wak* 5 est exprimé dans les organes verts. L'expression des gènes *Wak* est donc régulée par différents facteurs liés au stade de développement, aux facteurs environnementaux biotiques et abiotiques (He *et al.* 1999, Kohorn, 2001 et Wagner *et al.* 2001).

La perception de ces facteurs par la cellule végétale, et peut-être par *Wak*, est encore très peu connue chez les plantes. La position particulière de *Wak* à l'interface entre la paroi cellulaire et le plasmalemme fait de cette protéine un acteur potentiel dans cette communication. Différentes études ont permis de montrer que *Wak* entretiendrait des relations privilégiées avec certains composants de la paroi cellulaire (Wagner *et al.* 2001).

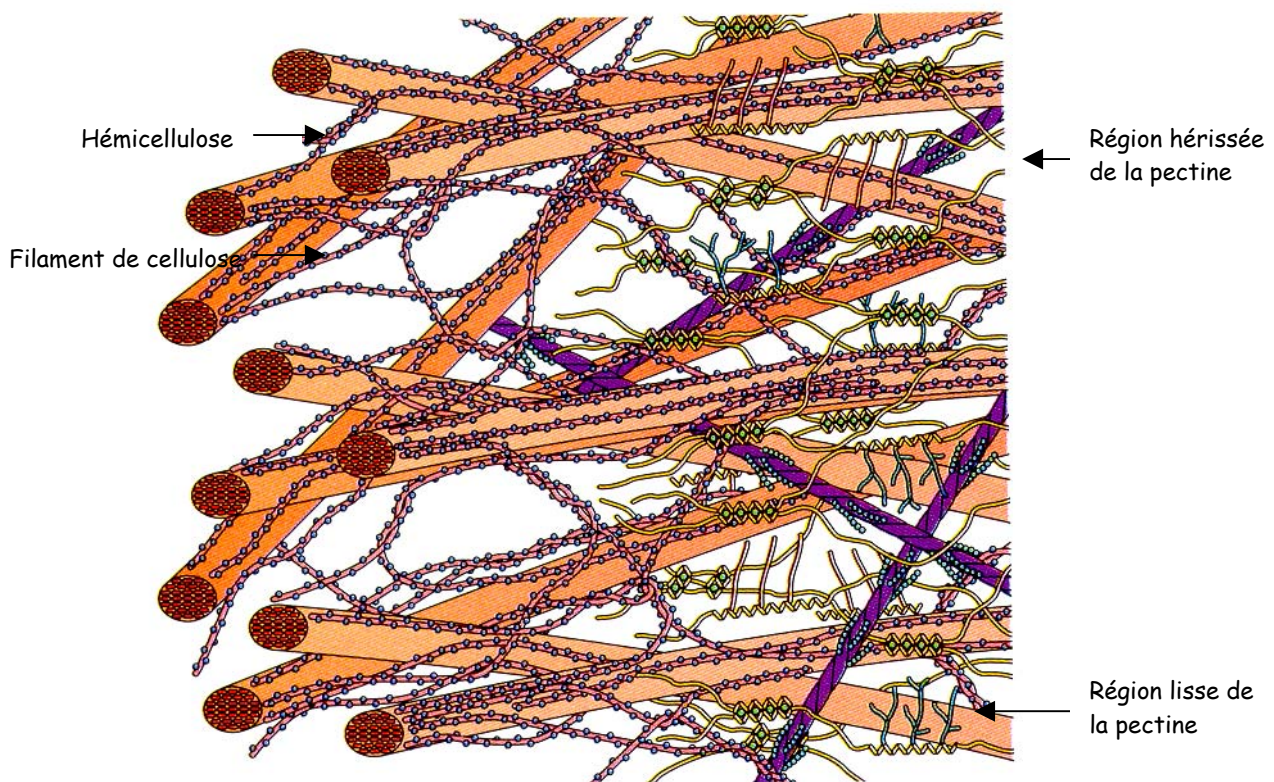


Figure 23 : Modèle de la paroi cellulaire végétale.

Rhamnogalacturonan I

Homogalacturonan

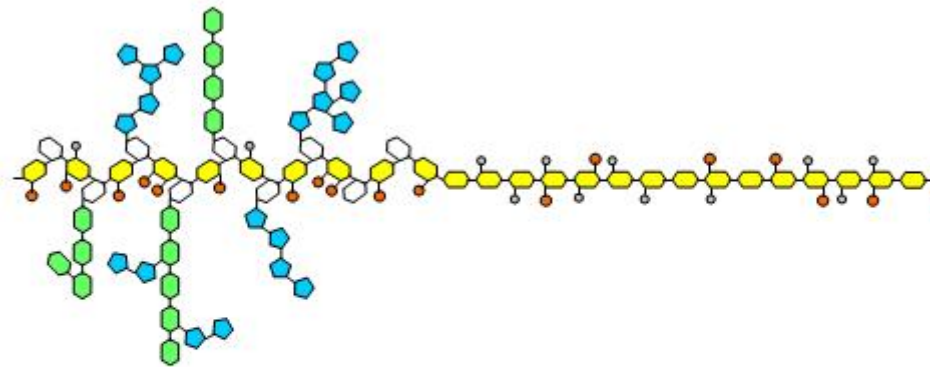


Figure 24 : Représentation des régions lisses et de régions hérissées de la pectine. Les régions lisses sont constituées d'homogalacturonane, un polymère d'acide galacturonique en liaison α 1-4 ; tandis que les régions hérissées sont constituées de rhamnogalacturonane I, un hétéropolymère de (1→4) α-D- acide galacturonique et (1→2) α-L-rhamnose porteurs de courtes chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes ou d'arabinogalactanes.

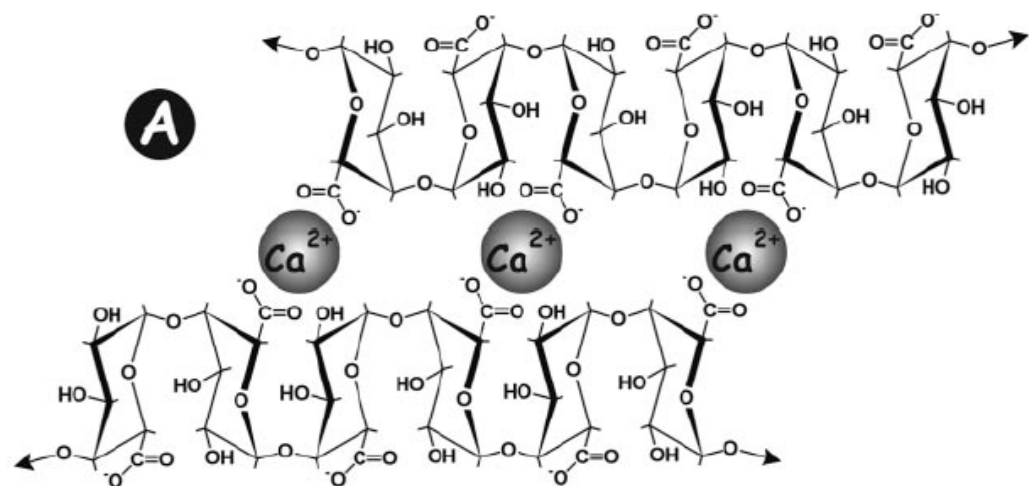


Figure 25 : Représentation du modèle en « boîte à œuf ». Les régions lisses de la pectine peuvent s'associer coopérativement en présence de cations bivalents tels que le calcium et ainsi former des régions de jonction. Pour la simplicité du schéma, seul trois ions Ca^{2+} ainsi que six résidus d'acide galacturonique sont représentés ; la structure minimale stable implique, quand à elle, au moins 9 acides galacturoniques et 5 ions calcium.

3. Interaction de Wak avec la matrice extracellulaire

Interaction de Wak avec la pectine

Lors des premières expériences de purification de Wak, He *et al.* (1996) ont constaté que ces protéines étaient fortement liées à la paroi cellulaire. Les procédures classiques d'extraction de protéines pariétales ne permettaient pas de solubiliser Wak. La solubilisation de Wak n'était constatée qu'après avoir fait bouillir les extraits de feuilles dans une solution SDS 4 % et DTT 50 mM ou après un traitement aux pectinases. Vu le traitement drastique que nécessite la séparation de ces deux composés, He et Wagner (1996, 2001) ont proposé que le lien entre la pectine et Wak devait être de nature covalente. Des résultats récemment obtenus au laboratoire semblent cependant indiquer que l'interaction entre Wak1 et la pectine pourrait être non covalente (A. Decreux communication personnelle). La difficulté rencontrée pour extraire Wak dans les premières expériences pourrait être attribuées à l'utilisation de trop fortes concentrations en calcium, dans les tampon d'extraction qui « figerait » la paroi, et donc limiterait la mobilité de Wak (A. Decreux communication personnelle).

L'interaction de Wak avec la pectine est particulièrement intéressante vu la place centrale de la pectine dans de nombreux processus physiologiques (Radley 2000). Les pectines sont des polysaccharides complexes formant une matrice hydrophile entre les microfibrilles de cellulose (figure 23). Elles sont sécrétées par le réseau endomembranaire et ce n'est qu'une fois en paroi qu'elles s'associent avec la cellulose (Cosgrove 2001). Les pectines sont composées de régions lisses et de régions hérissées. Les régions lisses sont constituées d'homogalacturonane, un polymère d'acide galacturonique en liaison α 1-4 (figure 24); tandis que les régions hérissées sont constituées de rhamnogalacturonane I, un hétéropolymère de (1→4) α -D-acide galacturonique et de (1→2) α -L-rhamnose porteur de courtes chaînes latérales d'arabinanes, de galactanes ou d'arabinogalactanes (figure 24). Les régions homopolygalacturoniques, relativement linéaires peuvent s'associer coopérativement en présence de cations bivalents tels que le calcium (modèle en « boîte à œuf ») (figure 25) et former des régions de jonction. Le degré de polymérisation, le degré d'estérification par les groupements méthyles ou acétyles des acides galacturoniques et le pH de la paroi permettent de réguler le degré d'association des zones homogalacturoniques entre elles (Liners *et al.* 1992, Brent 2001). Des résultats récents obtenus au laboratoire montrent que les zones homopolygalacturonanes des pectines peuvent se fixer spécifiquement sur le domaine extracellulaire de Wak1 et, plus particulièrement, sur un domaine protéique excluant le domaine EGF (A. Decreux communications personnelles). Différents paramètres affectant la formation des zones de jonction entre les chaînes pectiques pourraient donc potentiellement affecter l'interaction avec la protéine Wak1, et éventuellement, le rôle signalétique de Wak au niveau de l'interface paroi-plasmalemmes. Bien que l'éventuelle fonction signalétique de Wak1 ne soit pas encore connue, on sait que l'interaction avec la pectine entraîne la phosphorylation d'une fraction des protéines Wak1, ce qui laisse entrevoir l'existence d'une voie de transduction du signal intracellulaire (Wagner *et al.* 2001).

Interaction avec une GRP

Ran Park et ses collaborateurs (2001) ont mis en évidence, par la technique double hybride, une interaction *in vitro* entre la protéine Wak1 et AtGRP3. Cette interaction a été

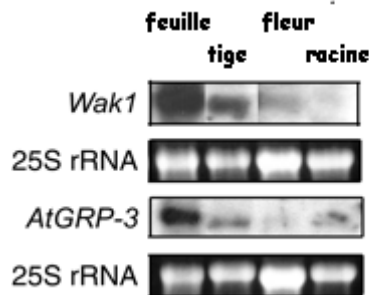


Figure 26 : Northern blot mettant en évidence les transcrits wak1 et AtGRP3 dans différents organes de la plante. Wak1 et AtGRP3 sont transcrits essentiellement dans les feuilles et dans les tiges (Park et al 2001).

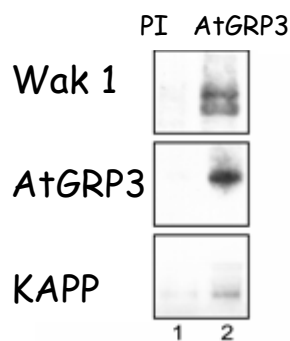


Figure 27 : Western blot d'un extrait protéique immunoprécipité avec un anticorps anti-AtGRP3. La révélation a été réalisée avec un anticorps anti-wak1, anti-AtGRP3 ou anti-KAPP respectivement. Cette expérience suggère que wak1, AtGRP3 et KAPP appartiennent à un même complexe protéique (Park et al 2001). PI = pré-Immun

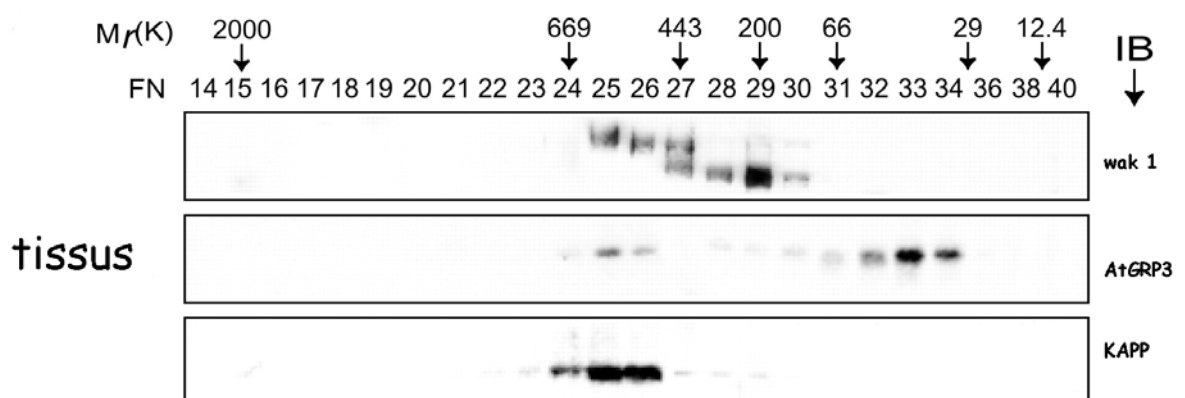


Figure 28 : Résultat d'une chromatographie d'exclusion de taille suivi d'un western blot réalisé au départ des différentes fractions protéiques récoltées en sortie de chromatographie. Les révélation ont été réalisées par des anti-corps anti-wak1, anti-AtGRP3, anti-KAPP. Cette seconde expérience confirme l'existence d'un complexe protéique contenant au minimum wak1, AtGRP3 et KAPP (éluates 25-26) (Park et al 2001).

confirmée *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-Wak1 et anti-AtGRP3. AtGRP3 appartient à la super-famille des protéines riches en glycine (GRP) regroupant des protéines sécrétées et des protéines ancrées en membrane. AtGRP3

fait partie des protéines riches en glycine sécrétées et on la retrouve dans les organes où l'on retrouve Wak (figure 26). Le criblage a également montré que Wak1 interagissait uniquement avec AtGRP3 et pas avec d'autres isoformes. A l'inverse, AtGRP3 peut interagir avec plusieurs isoformes de Wak (1, 3, 5). La zone responsable de l'interaction entre AtGRP3 et Wak1 correspond à la partie carboxy-terminale riche en cystéine d'AtGRP3 et le domaine EGF de la protéine Wak1.

Des expériences de co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-AtGRP3, suivi d'un Western Blot révélé par un anticorps anti-Wak1, anti-AtGRP3 ou anti-KAPP (figure 27) ont permis de montrer que Wak1 et AtGRP3 font partie d'un complexe multimérique de 500 kDa comprenant la phosphatase KAPP. Ces résultats ont été confirmés par une chromatographie d'exclusion combinée à un western blot (figure 28). Pour cette expérience, des extraits protéiques ont été déposés sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille. Les différentes fractions ont ensuite été analysées sur western blot et révélées avec des anticorps anti-Wak1, anti-AtGRP3 ou anti-KAPP. Les résultats obtenus montrent une co-élution de Wak1, AtGRP3 et KAPP. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus par co-immunoprécipitation, permettent de dire que ces trois protéines forment bien un complexe multimérique. Des expériences similaires réalisées en absence d'AtGRP3 montrent que l'interaction avec Wak1 est indispensable à la formation du lien avec KAPP (Park *et al.* 2001).

4. Les rôles de Wak

Dans la réponse aux pathogènes

Pour se défendre contre une infection par un virus, une bactérie, un champignon, un nématode ou un insecte, les plantes supérieures se sont équipées de barrières chimiques et mécaniques constitutives ainsi que d'un système de défense inductible. Dans de nombreuses situations, la plante est capable de se défendre contre l'attaque d'un pathogène par l'induction d'une réponse locale dite « réponse hypersensible » (HR) et d'une réponse systémique dite « résistance systémique acquise » (SAR) (Holt III *et al.* 2003, Montesano *et al.* 2003, Shah 2003).

La réponse locale permet de contenir la progression du pathogène au lieu d'infection. La réponse hypersensible consiste en une mort programmée des cellules de la région infectée, limitant ainsi la zone de propagation du pathogène. Elle induit le renforcement de la paroi cellulaire et la production de protéines de défense, dites protéines PR, et la synthèse de phytoalexines (antibiotiques végétaux).

La réponse systémique confère une résistance à l'échelle de la plante contre le pathogène rencontré, mais aussi contre d'autres pathogènes (Holt III *et al.* 2003, Montesano *et al.* 2003, Shah 2003). La réponse SAR peut ainsi être comparée à un « vaccin » pour la plante puisqu'elle confère une protection post-posée dans le temps (Montesano *et al.* 2003).

La réponse locale et la réponse systémique sont précédées d'une augmentation de la synthèse d'acide salicylique (SA). Bien que le rôle de SA reste encore assez obscur dans la réponse systémique, sa production induit une recrudescence de l'expression des protéines PR (Holt III *et al.* 2003, Montesano *et al.* 2003, Shah 2003).

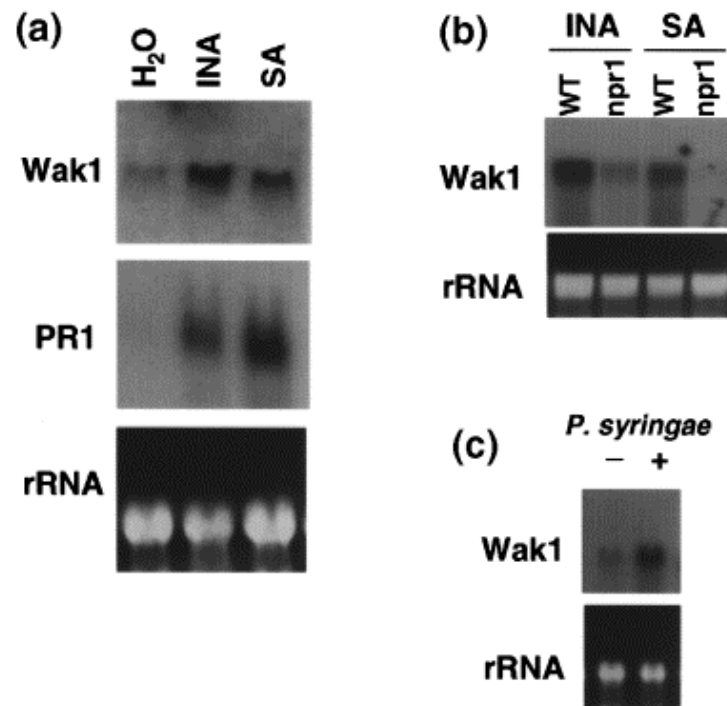


Figure 29 : Induction transcriptionnelle de *wak1* par INA, SA et *Pseudomonas syringae*. **A.** Northern Blot d'ARN de plantes traitées avec H₂O, SA ou INA montrant que la transcription du gène wak 1 est, comme celle du gène PR 1, sensible à la présence de SA ou de son analogue INA. **B.** Comparaison du niveau de transcription de Wak1 chez des plantes sauvages (*wt*) et des plantes mutantes *npr1* présentant un défaut dans la transduction du signal SA-dépendante. Cette expérience confirme que wak1 est une protéine PR. **C.** Northern Blot montrant l'induction de la transcription du gène wak1 par une infection par *Pseudomonas syringae* (He et al 1998).

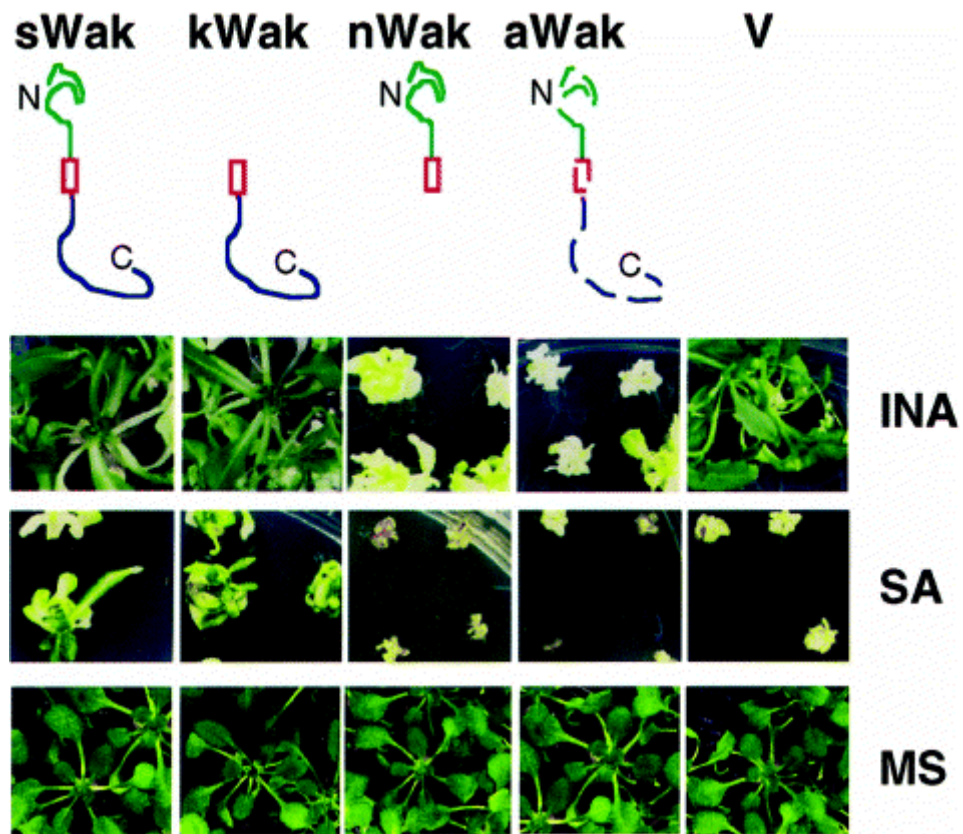


Figure 30 : Phénotypes des plantes transformées avec les différentes constructions *wak1* reprises en haut de la figure. Les plantes transformées avec les constructions anti-sens (aWak) et nWak survivent moins bien en présence de faibles concentrations en INA que les plantes transformées avec un vecteur vide (V). Les plantes transformées avec les constructions sens (sWak) et kWak résistent mieux aux fortes concentrations en SA que les plantes contrôles (V). Sur milieu de base (MS), les plantes transformées n'affichent aucun phénotype particulier (He et al 1998).

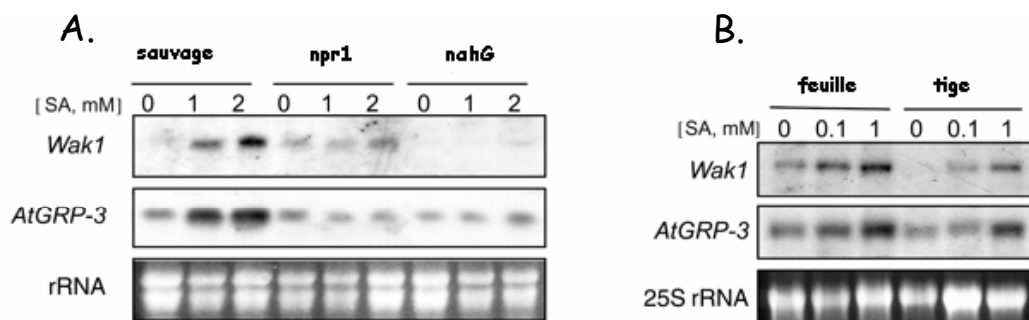


Figure 31 : **A.** Induction de la transcription de *wak1* et d'*AtGRP3* suite à des traitements au SA dans des plantes sauvages, des plantes mutées *npr1* ou des plantes transformées avec le gène *nahG* qui empêche l'accumulation de SA. Le niveau de transcription de *AtGRP3*, ainsi que celui de *wak1* est réduit chez les plantes *npr1* et les plantes *nahG*. La transcription des deux gènes est activée par des concentrations similaires en SA. **B.** Induction de la transcription des gènes *wak1* et *AtGRP3* dans les feuilles et les tiges en présence de SA (Park et al. 2001).

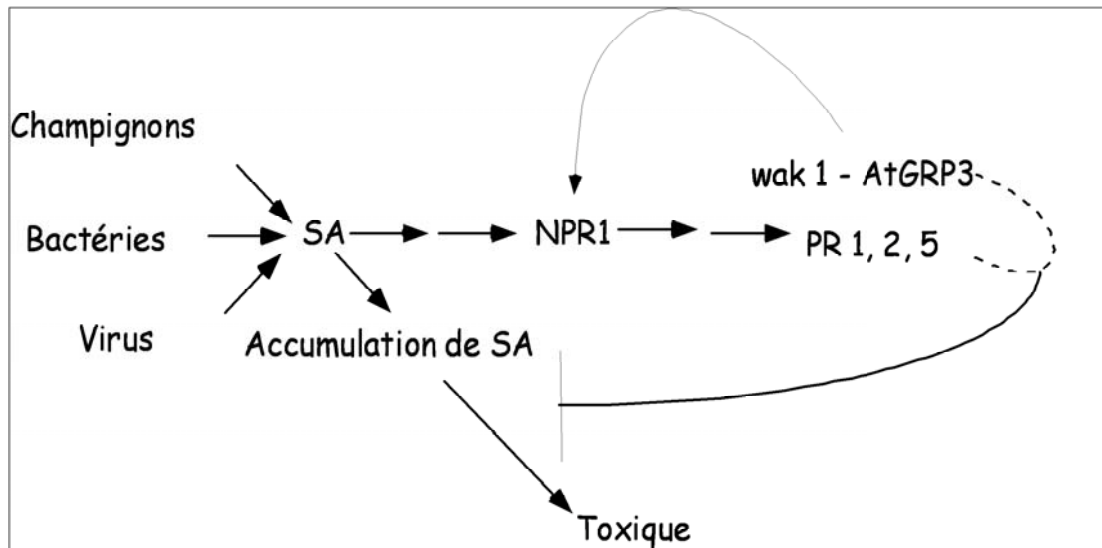


Figure 32 : Modèle d'action de wak1 dans la réponse aux pathogènes. Lors de l'attaque par un pathogène, il y a synthèse et accumulation de SA. SA active, via NPR1, la transcription des protéines PR (y compris wak1). Les protéines PR, ainsi que wak1—probablement associé à AtGRP3, participeraient à l'activation d'un mécanisme de détoxification de SA. Le modèle suggère l'existence d'une boucle de rétroaction positive du couple AtGRP3- wak1 sur le régulateur NPR1 afin d'entretenir l'effet protecteur (He et al 1998).

He et son équipe (1998) ont montré, par Northern Blot, que l'attaque d'un pathogène, ou un traitement au SA ou à l'INA (homologue synthétique de SA) induisaient une augmentation du niveau de transcription de *Wak1* (figure 29 C). Cette réponse était parallèle à l'augmentation du nombre de transcrits de protéines PR (figure 29 A). L'induction SA dépendante de Wak laisse sous-entendre que Wak1 pourrait être une protéine PR. Pour vérifier cette hypothèse, la transcription de *Wak1* a été mesurée dans des plantes possédant la mutation *npr1* qui affecte l'activité de NPR1, un régulateur positif de la voie des protéines PR induites par SA, et qui bloque la réponse SAR (He et al. 1998, Shah 2003). Chez le mutant *npr1* traitée avec SA ou INA, l'induction transcriptionnelle de *Wak1* est moins importante que celle observée chez les plantes sauvages (figure 29 B) indiquant clairement que Wak1 est une protéine PR.

He et ces collaborateurs (1998) ont également cherché à savoir quel pourrait être le rôle de Wak1 dans le cadre de la réponse aux pathogènes. Pour ce faire, plusieurs transformations par *Agrobacterium tumefaciens*, avec quatre constructions Wak1 sous le contrôle du promoteur inductible PR1, ont été réalisées :

- une construction sens (sWak)
- une construction antisens (aWak)
- une construction (nWak) comprenant le domaine extra-membranaire et extracellulaire de Wak1
- une construction (kWak) comprenant les domaines transmembranaire et kinase de Wak1 (figure 30).

Les plantes transgéniques obtenues ont été traitées avec SA ou INA et le taux de survie des différents transformants a été mesuré. En présence de faibles concentrations de SA ou INA (0.1 mM), les plantes transformées avec la construction antisens, c'est-à-dire celles qui ne possèdent plus la protéine Wak1, meurent. Cette observation suggère que Wak est

nécessaire à la détoxification de SA. De plus, la présence d'une plus grande quantité de protéine Wak1 (construction sens) permet à la plante de survivre à de plus fortes concentrations en SA (0.5 mM). Le plus étonnant est cependant que les plantes qui expriment de manière ectopique le domaine kinase de Wak (kWak) supportent mieux les plus fortes concentrations en SA que celles qui n'expriment que le domaine extracellulaire (nWak) (figure 30). Ces constructions ont donc permis de mettre en évidence que Wak1 est nécessaire à la plante pour détoxifier SA, mais que Wak1 n'interagit pas directement avec le pathogène (He et al 1998).

Assez curieusement, lorsqu'on traite des plantes avec SA ou INA, on observe une augmentation de la transcription d'AtGRP3 (figure 31). Tout comme pour Wak1, la mutation *npr1*, ou l'introduction du gène *nahG* (qui permet la dégradation de SA), empêchent cette augmentation. Il y a donc superposition parfaite des profils d'expression de transcription des deux gènes et une co-localisation des protéines correspondantes dans la paroi cellulaire (Park *et al.* 2001). Le fonctionnement de Wak1 ou du complexe Wak1/AtGRP3 dans la réponse aux pathogènes n'est cependant pas encore élucidé. On sait que la synthèse de SA active l'accumulation de protéines PR, dont Wak1, et la production d'AtGRP3 via une voie NPR1-dépendante. Les protéines PR1, 2,5 et Wak1 participeraient d'une manière ou d'une autre à la détoxification de SA. Des résultats expérimentaux suggèrent également que Wak1

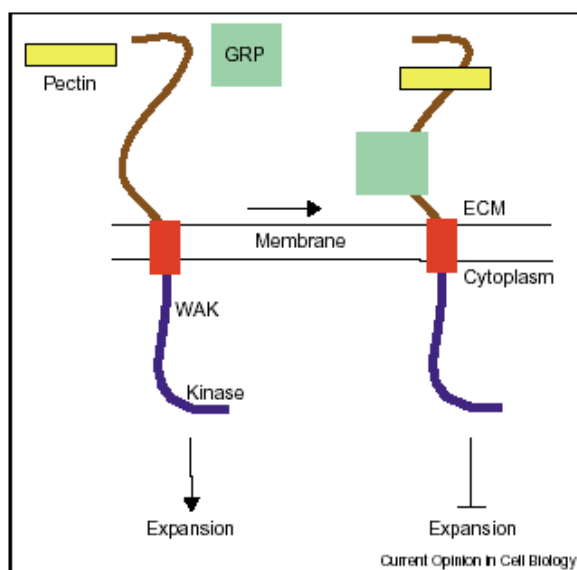


Figure 33 : Modèle de la régulation de l'élongation cellulaire par wak. Dans ce modèle, en condition normale, wak n'est pas lié à AtGRP3 ni à la pectine et l'élongation pourrait avoir lieu. Lorsque l'élongation doit être inhibée, comme par exemple lors de l'attaque par un pathogène, la pectine et AtGRP3 se fixeraient à wak et inhiberaient l'élongation. Bien que ce modèle n'ait pas encore été validé, il est compatible avec l'arrêt de l'élongation cellulaire observée en cas d'attaque par un pathogène (Kohorn 2001). régulerait l'activité de NPR1 par un feedback positif (figure 32). Les détails moléculaires des interactions protéine - protéine et de la détoxification ne sont pas encore connus (Park *et al.* 2001).

Dans l'élongation cellulaire

Chez les cellules végétales, la paroi cellulaire confère une forme et une structure à la cellule ainsi qu'à tout l'organe (Wagner et al 2001). Cette paroi cellulaire est une structure rigide et modelable qui joue un rôle clef dans l'élongation cellulaire (Lally *et al.* 2001, Kohorn 2000). Par leur localisation et leur lien à la pectine, les Wak sont des candidats potentiels pouvant participer directement ou indirectement à la régulation de l'expansion cellulaire. Lally *et al.* (2001) ont réalisé une construction antisens du gène *Wak 4* sous le contrôle d'un promoteur sensible au dexaméthasone (DEX), un glucocorticoïde synthétique, pour éteindre toutes les isoformes Wak. Les plantes transformées montraient des retards dans leur développement et leurs feuilles étaient plus petites que celles des plantes non transformées. Des observations

par microscopie électronique à balayage ont permis de montrer que la diminution de la taille des feuilles était due à une diminution de la taille des cellules et non du nombre de cellules. Ces résultats suggèrent que Wak n'intervient que dans le phénomène d'élongation cellulaire et n'intervient pas dans la division cellulaire. De plus, lors de la suppression de l'expression de Wak, on observe une diminution de la quantité de certaines expansines connues pour rompre les liens non covalents entre les polysaccharides de la paroi (Lally et al 2001). Un modèle de régulation de l'élongation par Wak a été proposé par Kohorn (figure 33). Dans ce modèle, lorsque Wak n'est pas liée à la pectine ni à AtGRP3 l'élongation pourrait avoir lieu. Lorsque l'élongation doit être inhibée, comme par exemple lors de l'attaque par un pathogène, la pectine et AtGRP3 se fixeraient à Wak et inhiberaient l'élongation. Ce modèle n'a pas encore été validé et il ne tient pas compte des nombreux autres facteurs impliqués dans la régulation de l'élongation cellulaire.

C. Comment aborder l'étude de l'activation de Wak1 par la pectine ?

Dans les points précédents, nous avons vu que la pectine interagissait avec le récepteur Wak1. Des résultats récents obtenus au laboratoire indiquent que Wak1 interagit également avec des oligomères de pectine (A. Decreux, communication personnelle). Il a aussi été démontré que, lors de cette liaison, le récepteur était phosphorylé (Wagner et al. 2001). Il n'a cependant pas été démontré que la liaison de la pectine activait une cascade de transduction du signal en aval de Wak1. Cette démonstration est à l'heure actuelle encore difficile car on ne connaît aucun des substrats de Wak1.

Bien plus, si la pectine active une voie de transduction via son interaction avec Wak1, il faudra trouver un moyen de distinguer ce qui est activé effectivement via Wak1 de ce qui serait activé via d'autres récepteurs interagissant avec la pectine. Les pectines et les fragments de pectine sont, en effet, des bio-modulateurs pléiotropiques agissant sur plusieurs processus physiologiques importants de la plante tels que la morphogenèse et les interactions plante-pathogène. Les fragments pectiques sont connus pour avoir un rôle signalétique qui dépend de leur degré de polymérisation. Il a été démontré que des oligomères d'acide galacturonique avec un degré de polymérisation compris entre 9-16 et en présence de Ca^{2+} sont capables d'induire une dépolarisation membranaire, une alcalinisation du cytosol, une augmentation de l'activité en calcium cytosolique et la transcription de nombreux gènes de défense dans des cultures en suspension de carottes (Messiaen et Van Cutsem 1994). La contrainte du degré de polymérisation correspond, en réalité, à la taille minimale pour que les oligomères pectiques adoptent une conformation en « boîte à œuf » et exercent leur rôle d'éliciteur (Liners *et al.* 1992, Messiaen et Van Cutsem 1994). Rappelons que l'interaction de Wak1 avec les fragments pectiques dépend également de la formation de cette conformation en « boîte à œufs » (A. Decreux, communication personnelle).

Dans ce contexte très particulier d'un ligand potentiel multi-tâche, il est donc difficile d'étudier l'activation d'un récepteur particulier dont on ne connaît aucune cible dans la cellule végétale. Face à cette difficulté, les méthodes d'analyse avec « *à priori* » (Northern blot, RT-PCR quantitative,...) qui permettraient d'étudier l'impact des pectines ou de fragments pectiques sur quelques gènes cibles sont à exclure.

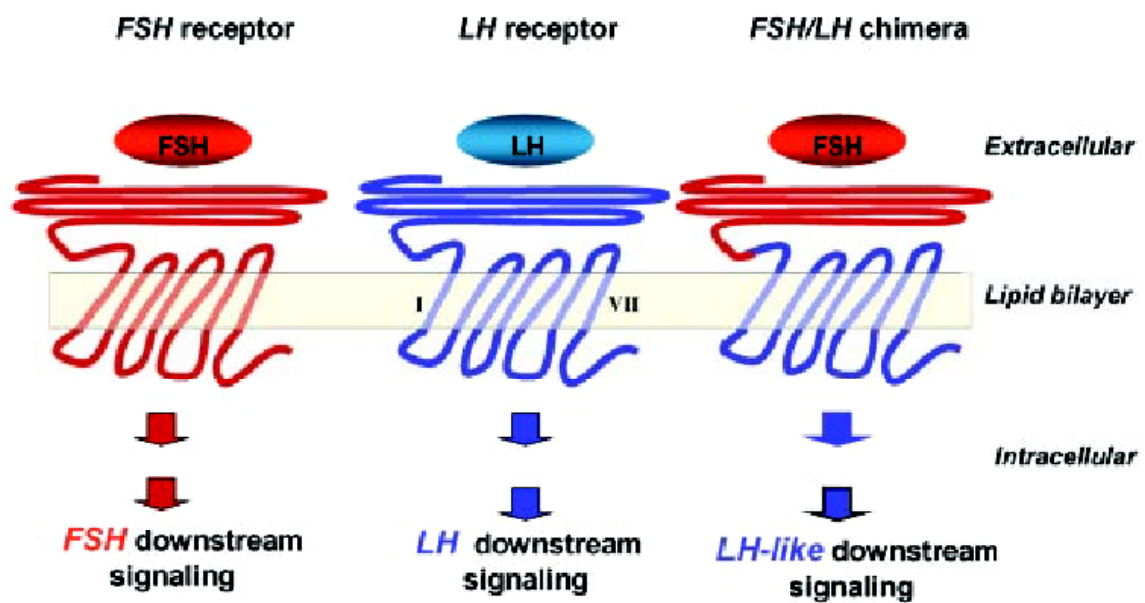


Figure 34 : Représentation schématique d'un récepteur hybride. Le récepteur hybride FSH / LH est composé de la partie extracellulaire du récepteur à la FSH et des sept domaines transmembranaires et de la partie N-terminale du récepteur du récepteur à la LH. L'application de FSH active de la voie de la LH.

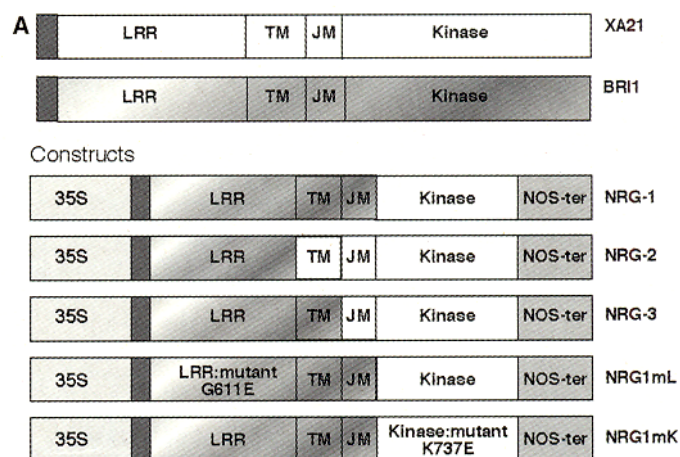


Figure 35 : Représentation schématique des différentes constructions du récepteur hybride BRI1-Xa21. NRG-1 est composé du domaine LRR, du domaine transmembranaire (TM) et du domaine juxtamembranaire (JM) de bri1 et du domaine kinase de Xa21. NRG-2 est composé du domaine LRR de BRI1 et du domaine TM, JM et du domaine kinase de Xa21. NRG-3 est composé du domaine LRR, TM de BRI1 et du domaine JM et du domaine kinase de Xa21. NRG1mL est une construction basée sur NRG1 avec une mutation dans la région de 70 acides aminés du domaine LRR de bri1. NRG1mK est une construction basée sur NRG1 avec une mutation au niveau du domaine kinase Xa21.

Des méthodes d'investigations sans « *à priori* » telles que les micro-arrays, le SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), AFLP sur ADNc (Amplification Fragment Length Polymorphism) ou l'électrophorèse à 2 dimensions ou des approches plus physiologiques (mesure de calcium cytosolique, par exemple) pourraient donc être envisagées pour identifier des cibles potentielles de l'interaction pectine-Wak1 ou établir un lien fonctionnel entre la liaison de la pectine et Wak1. Ces approches impliquent cependant des comparaisons entre plantes sauvages et plantes spécifiquement mutées au niveau du gène Wak1. De tels mutants d'*Arabidopsis thaliana* sont actuellement disponibles dans les banques de graines (<http://www.arabidopsis.org/servlets/Order?state=catalog>). Malgré leur puissance d'investigations, ces techniques sont cependant, pour certaines, très lourdes d'application ou nécessitent bien souvent un équipement coûteux. A cela, il faut rajouter la problématique intrinsèque à tout bio-essai dont on ne connaît pas la cinétique de réponse. On ne connaît, *à priori*, ni la durée de la stimulation, ni l'âge optimal des cellules pour l'application du traitement, ni la cinétique de la réponse (de quelques minutes à plusieurs jours). Tous ces inconvénients nous ont amenés à choisir une autre approche : la construction d'un récepteur hybride.

Cette approche a déjà été utilisée avec succès à plusieurs reprises dans des contextes très différents. Elle a permis, par exemple, de montrer que le récepteur GH (hormone de croissance) cytosolique des cellules animales était bien activé par GH. Dans ce cas, le récepteur hybride était composé du domaine extracellulaire du récepteur GH et du domaine intracellulaire du récepteur de l'EGF (Hellgren *et al.* 2004). Cette technique a aussi été utilisée pour l'étude de récepteurs couplés à des protéines G pour identifier des ligands potentiels de récepteurs orphelins. Un des récepteurs hybrides ainsi construit était composé de la partie extracellulaire de FSH couplée aux sept domaines transmembranaires et à la partie C-terminale du récepteur au LH. Cette étude de faisabilité montrait qu'il était possible d'activer spécifiquement la voie « LH » en présence de FSH (figure 34) (Yin *et al.* 2004).

Cette approche a également été appliquée chez les végétaux dans le cadre de l'étude du récepteur des brassinostéroïdes, un récepteur impliqué dans l'élongation cellulaire et dont la structure est similaire à celle du récepteur Wak1. Le but de l'expérience consistait à démontrer que les brassinostéroïdes étaient bien les ligands du récepteur BRI1. Pour ce faire, un récepteur hybride entre le domaine extracellulaire du récepteur BRI1 et le domaine kinase du récepteur Xa21 a été construit. Xa21 est un récepteur qui confère au riz une résistance contre la bactérie *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Ne sachant pas, *à priori*, quelles parties de BRI1 étaient nécessaires à la liaison du brassinole et à la transduction du signal à l'intérieur de la cellule, trois récepteurs hybrides ont été testés (figure 35):

- NRG-1 composé du domaine LRR, du domaine transmembranaire (TM) et du domaine juxtamembranaire (JM) de BRI1 et du domaine kinase de Xa21
- NRG-2 composé du domaine LRR de BRI1 et du domaine TM, JM et kinase de Xa21
- NRG-3 composé du domaine LRR, TM de BRI1 et du domaine JM et kinase de Xa21

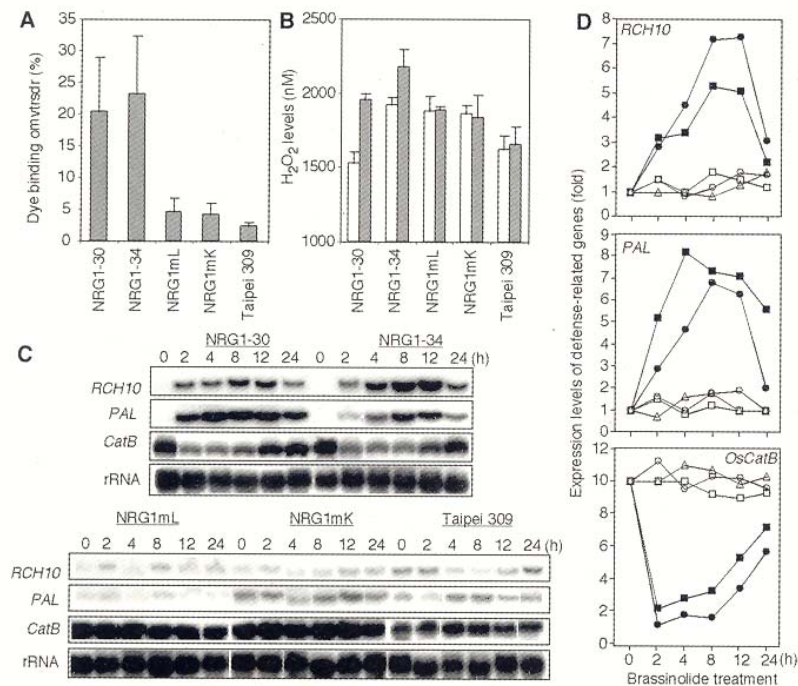


Figure 37 : Réponse cellulaire des cultures en suspension de riz non transformées et transformées avec les constructions NRG-1, NRG1 ml ou NRG1 mk traitées avec du brassinole. **A.** mesure du taux de mortalité des cellules montrant que les plantes transformées avec NRG1 ont un taux de mortalité plus élevé que les cultures contrôles. Cette augmentation est due à l'activation de la réponse HR par Xa21. **B.** Mesure de la production d'H₂O₂. Les cellules transformées avec NRG-1 présentent une augmentation significative du niveau d'H₂O₂. **C.** Comparaison par Northern blot de l'abondance des transcrits des gènes RCH10 (Rice defense chitinase), PAL (phenylalanine ammonium-lyase) et CatB (catalase) impliqués dans la réponse de défense. L'activité de RCH10 et de PAL (gènes de défense) augmente dans les cellules transformées avec NRG-1 tandis que l'activité catalase (détoxification d'H₂O₂) diminue. **D.** Analyse graphique des Northern blot du point **C**.

Connaissant les cibles de Xa21 chez le riz, il était possible de vérifier l'impact de brassinostéroïdes sur ces cibles. Seule la construction NRG-1 s'est avérée capable d'initier, après traitement aux brassinolés, une réponse hypersensible (figure 37). Cette réponse se traduit par une mort programmée des cellules infectées, un choc oxydatif (production d'H₂O₂) et une activation spécifique de certains gènes de défense (chitinase, phénylalanine ammonia-lyase et catalase). Deux constructions contrôles basées sur NRG-1, NRG1ml et NRG1mk, ont permis de vérifier, d'une part, qu'une mutation au niveau du site potentiel de liaison des brassinostéroïdes bloque la réponse Xa21 ; et, d'autre part, qu'une mutation qui annule l'activité catalytique du domaine kinase de Xa21 bloque également la réponse Xa21 (figure 36). Les concentrations en brassinolés utilisées pour activer l'expression de gènes de défense chez les plantes transformées avec NRG-1 étaient similaires aux concentrations physiologiques en brassinostéroïdes nécessaires pour induire l'élongation cellulaire (He *et al.* 2000).

D. Objectifs du mémoire

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons contribuer à l'étude de l'interaction entre le récepteur Wak1 et la pectine, un des constituants majeur de la paroi cellulaire végétale. Nous allons construire un récepteur hybride inspiré du bio-essai utilisé par He et al. (2001) pour mettre en évidence l'activation du récepteur bri 1 par un brassinostéroïde.

Le récepteur hybride Wak1-bri1 sera construit sur le même modèle que la construction NRG1, le récepteur hybride bri1-Xa21 (He et al. 2001). Ce récepteur fonctionnel était composé des domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de bri1 et du domaine kinase de Xa21. Dans le cas de notre mémoire, nous allons construire un récepteur hybride Wak1-bri1 comprenant les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de Wak1 et le domaine kinase de bri1.

Le premier objectif sera donc de cloner les séquences codant pour les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire du gène *Wak1* et la séquence codant pour le domaine kinase du gène *Bri1*. Ces deux séquences seront ensuite jointes pour générer une séquence hybride qui sera clonée dans plasmide Ti pour la transformation de plantes par *Agrobacterium*.

Notre second objectif était de transformer des cultures en suspension d'*Arabidopsis thaliana* avec la construction possédant le récepteur hybride et d'obtenir des transformants stables.

Notre troisième objectif a été de mettre au point la technique qui servira à mesurer l'augmentation ou la diminution de la transcription de deux gènes de réponse aux brassinostéroïdes : le gène de la cycline *CycD3* et le gène du facteur de transcription *BRH*.

II. Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

A. Culture en suspension de cellules végétales

1. Arabidopsis thaliana écotype Landsberg erecta (L-MM1)

1) Milieu MSMO (BM) et milieu de callogenèse (CM) (pour 1l):

1. Peser 4,43 g MSMO (milieu minimal organique) et 30 g de sucre.
2. Dissoudre dans 900 ml d'eau désionisée.
3. Ajuster le pH à 5,7 avec du NaOH ; porter à volume.
4. Ajouter, pour le milieu BM, 500 µl d'acide naphthalène acétique [stock : 1 mg/ml] et 50 µl de kinétine [stock : 1mg/ml]. Pour le milieu CM, ajouter 500 µl d'acide naphthalène acétique [stock : 1 mg/ml] et 500 µl d'IPAR de [stock : 1mg/ml] et 2 g de Gelrite.
5. Autoclaver.

Culture :

Les cultures en suspension sont repiquées hebdomadairement en diluant 6 ml de culture dans 44 ml de milieu frais autoclavé dans un erlenmeyer de 250 ml et placées sur un agitateur orbital (120 rpm) à 22 °C avec une photopériode de 16h de lumière/ 8h d'obscurité.

2. Arabidopsis thaliana écotype (A-TL)

Milieu B-5 Gamborg (BM) et milieu de callogenèse (CM) (pour 1l):

1. Peser 3,2 g de B-5 (minimum organique) et 30 g de sucre.
2. Dissoudre dans 900 ml d'H₂O désionisée.
3. Ajuster le pH à 5,7 avec du NaOH ; porter à volume.
4. Ajouter, pour le milieu BM, 200 µl d'acide naphthalène acétique [stock : 1 mg/ml] et 100 µl de kinétine [stock : 1mg/ml]. Pour le milieu CM, ajouter 500 µl d'acide naphthalène acétique [stock : 1 mg/ml] et 500 µl de IPAR [stock : 1mg/ml] et 2 g de Gelrite.
5. Autoclaver.

Culture :

Le repiquage et les conditions de culture sont identiques à celle de *Arabidopsis thaliana* écotype *Landsberg erecta*.

B. Culture d' E.Coli

1. Milieu LB liquide (pour 1l)

- 1) Peser 10 g de bactotryptone, 10 g de NaCl et 5 g d'extrait de levure.
- 2) Pour un milieu solide ajouter 15 g/l de Bacti Agar.
- 3) Mettre à pH 7,0 ; porter à volume avec de l'eau désionisée.
- 4) Autoclaver.

2. Transformation d'E. coli TOP 10F'

Matériel :

- Milieu SOC (Bactotryptone 2 %, Extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucose 20 mM)

Pour le choc thermique :

- Cellules thermocompétentes (One shot transformation kit, Invitrogen)
- Bain thermostatisé à 42 °C
- Etuve de culture à 37 °C

Pour électroporation :

- Cellules électrocompétentes (One shot transformation kit, Invitrogen)
- Electroporateur (Biorad)
- Cuvette d'électroporation 0,2 mm (Biorad)
- Agitateur et étuve de culture à 37°C

Protocole pour la transformation par choc thermique:

1. Dégeler sur glace un tube de 50 µl de cellules compétentes.
2. Ajouter X µl du produit de ligation directement dans le tube contenant les cellules compétentes et mélanger délicatement.
3. Incuber les cellules sur glace pendant 30 minutes.
4. Incuber les cellules pendant 30 secondes dans un bain à 42 °C, puis replacer les cellules sur glace pendant 2 minutes.
5. Ajouter 250 µl de milieu SOC (température ambiante).
6. Placer les cellules sous agitation (225 rpm) à 37 °C pendant une heure.
7. Etaler 100 µl de cellules sur milieu LB agar plus les sélectifs adéquats.
8. Sélectionner les transformants soit par test blanc/bleu ou par PCR sur colonies après une nuit d'incubation à 37 °C.

Protocole pour la transformation par électroporation:

1. Mettre la cuvette d'électroporation sur glace.
2. Dégeler sur glace un tube de 80 µl de cellules électrocompétentes.
3. Ajouter 4 µl maximum du produit de ligation.
4. Laisser 1 minute sur glace, puis transférer les cellules dans la cuvette.
5. Electroporer les cellules (25 µF et 2,5 kV, 200 Ohms).
6. Ajouter 480 µl de milieu SOC à température ambiante.
7. Incuber les cellules à 37°C sous agitation pendant 1h.
8. Etaler les bactéries sur milieu LB agar plus les sélectifs adéquats.
9. Sélectionner les transformants soit par test blanc/bleu ou par PCR sur colonies après une nuit d'incubation à 37 °C.

C. Culture d'*Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 et LBA4404/virG)

1. Préparation de cellules électrocompétentes

1. Lancer une culture de 1 l d'*Agrobacterium* dans du milieu LB liquide contenant 25 µg/ml streptomycine, 10 µg/ml rifampicine et 20 µg/ml gentamycine. Incuber les bactéries à 27 °C sous forte agitation jusqu'à une absorbance à 600 nm comprise entre 0,5-1,0.
2. Centrifuger les bactéries à 2455 g pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse Beckmann 12-21).
3. Eliminer le surnageant et reprendre les bactéries dans 500 ml d'eau froide stérile. Centrifuger comme ci-dessus. Recommencer cette opération deux fois.
4. Resuspendre le culot dans 20 ml de glycérol 10 % froid.

5. Transvaser les bactéries dans un tube Falcon de 50 ml. Centrifuger à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse BHG Hermle ZK364).
6. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot de bactéries dans 2 ml de glycérol 10 % froid.
7. Aliquoter les bactéries par 100 µl et les stocker à -70°C jusqu'à utilisation.

2. Electroporation d'Agrobacterium tumefaciens

1. Prélever 100 µl de cellules électrocompétantes et les placer dans une cuvette d'électroporation. Ajouter le mélange de ligation, mélanger et placer la cuvette dans la glace pendant 1 minute.
2. Electroporer les cellules (25 µF, 2,5 kV et 400 Ohms).
3. Ajouter aux bactéries 480 µl de milieu SOC à température ambiante.
4. Incuber les cellules à 30°C pendant 1h.
5. Etaler les bactéries sur milieu LB agar et incuber les boîtes pendant 2 à 3 jours à 30°C.

D. Méthodes relatives aux acides nucléiques

1. Miniprep d'ADN plasmidique :

Matériel et solutions :

- Tampon de lyse : glucose 50 mM, Tris EDTA 10 mM (pH 8,0) + lysozyme 4 mg/ml (fraîchement préparé)
- Solution NaOH/SDS : NaOH 0,2 M + SDS 0,1 %
- Solution d'acétate : acétate de potassium 3 M + acide acétique glacial 10 %
- Solution phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:25:1)
- Ethanol 96 % maintenu à -20 °C
- Tampon TE-RNase : 10 mM Tris-EDTA (pH 8,0) + 5 µg/ml RNase (DNase free)

Protocole :

1. Centrifuger 1,5 ml de suspension bactérienne à 12000 g (2 minutes, 4°C). Répéter cette opération 2-4 fois.
2. Ajouter au culot 150 µl de tampon de lyse. Incuber l'échantillon pendant 5 minutes dans la glace.
3. Ajouter 300 µl de NaOH / SDS. Incuber 5 minutes dans la glace.
4. Ajouter 150 µl de solution d'acétate. Vortexer 10 secondes et incuber 5 minutes dans la glace. Centrifuger à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
5. Au surnageant, ajouter 400 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:25:1). Vortexer énergiquement puis centrifuger à 12000 g pendant 2 minutes à 4°C.
6. Au surnageant (phase aqueuse), ajouter 1000 µl d'éthanol 96 % (maintenu à -20°C) et incuber 10 minutes à -70°C.
7. Centrifuger à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
8. Sécher le culot et le resuspendre dans 20 µl de tampon TE-RNase pendant 1 h à 37°C.

2. Maxiprep d'ADN plasmidique

Matériel et solutions :

- Kit Qiagen-tip 500
- Isopropanol (température ambiante)
- Ethanol 70% (température ambiante)

Protocole :

1. Lancer une culture bactérienne de 10 ml de milieu LB + antibiotique. Incuber les bactéries pendant 8 heures à 37 °C sur agitateur (~300 rpm).
2. Diluer de 1/500 à 1/1000 la culture de départ dans 100 ml milieu LB. Incuber à 37 °C pendant 12-16 h sur agitateur (~300 rpm).
3. Culoter les bactéries par centrifugation à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C.
4. Resuspendre le culot bactérien dans 10 ml de tampon P1.
5. Ajouter 10 ml de tampon P2, mélanger délicatement par inversion et incubé à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Ajouter 10 ml de tampon P3 maintenu à 4°C, mélanger immédiatement par inversion et incubé 20 minutes sur glace.
7. Centrifuger à > 20000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Prélever rapidement le surnageant contenant le plasmide.
8. Centrifuger le surnageant à > 20000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Enlever rapidement le surnageant contenant le plasmide.
9. Equilibrer une colonne QIAGEN 500 en appliquant 10 ml de tampon QBT.
10. Appliquer le surnageant de l'étape 8 dans la colonne QIAGEN 500.
11. Laver la colonne avec 2 x 30 ml de tampon QC.
12. Eluer l'ADN avec 15 ml de tampon QF.
13. Précipiter l'ADN en ajoutant 10,5 ml d'isopropanol. Mélanger et centrifuger immédiatement à > 15000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Décanter prudemment le surnageant.
14. Laver le culot d'ADN avec 5 ml d'éthanol 70% à température ambiante et centrifuger à > 15000 g pendant 10 minutes. Eliminer le surnageant.
15. Sécher le culot à l'air pendant 5-10 minutes et resuspendre l'ADN dans 500 µl de tampon TE.

3. Quantification des acides nucléiques

Matériel :

- Spectrophotomètre UV 1601-PC
- Cuvette en Quartz

Procédure :

1. Régler le spectrophotomètre en réalisant une ligne de base entre 200 et 300 nm
2. Régler le zéro de l'appareil en utilisant 1 ml de la solution dans laquelle vous avez resuspendu l'ADN ou l'ARN.
3. Ajouter 1 µl d'échantillon et mélanger par inversion.
4. Mesurer l'absorbance de l'échantillon de 260 nm à 280 nm au moyen d'une cuvette en quartz
5. Calculer la concentration de votre échantillon en sachant que 1 unité $DO_{260} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ADN ou $40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ADN

6. Le rapport des absorbance mesurer à 260/280, donne une idée de la pureté de l'échantillon

4. Electrophorèse sur gel d'agarose d'ARN ou d'ADN

Matériel et solutions :

- Cuve d'électrophorèse (Pharmacia biotech GNA 100).
- Agarose (Gibco BRL).
- Tampon TAE : Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Bromure d'éthidium (BET) : stock à 10 mg/ml
- Solution de chargement : bleu de bromophénol 0,025 %, glucose 40 %.

Protocole :

1. Préparer 50 ml d'agarose 1 % dans du tampon TAE et y ajouter 3 µl de BET.
2. Couler le gel dans un support adéquat et placer les peignes.
3. Ajouter 1 volume de solution de chargement à 5 volumes d'échantillon.
4. Après solidification, placer le gel dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE.
5. Déposer dans les puits un volume adéquat d'échantillon.
6. Faire migrer l'échantillon pendant environ 1h sous 80 mA.
7. Visualiser les acides nucléiques sur transilluminateur (302 nm UV).

5. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose (Protocole QIAEX)

Matériel :

- QIAEX II Agarose gel extraction kit (Qiagen)
- Bain chauffant thermostaté à 50°C

Protocole:

1. Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose avec un scalpel propre.
2. Peser le gel dans un tube et ajouter 3 volumes de tampon QX1 pour un volume de gel.
3. Vortexer pendant 30 secondes la résine QIAEX II.
4. Ajouter 30 µl de résine QIAEX II au tube contenant le gel.
5. Incuber 10 minutes dans un bain à 50°C pour solubiliser l'agarose et fixer l'ADN à la résine QIAEX II.
6. Mélanger toutes les 2 minutes pour remettre la résine en suspension.
7. Centrifuger à 13000 g pendant 30 secondes, puis enlever le surnageant en prenant garde de ne pas toucher le culot contenant la résine et l'ADN.
8. Laver le culot avec 500 µl de tampon QX1. Centrifuger à 13000 g pendant 30 secondes, puis ôter le surnageant.
9. Laver le culot deux fois avec 500 µl de tampon PE. Centrifuger à 13000 g pendant 30 secondes, puis éliminer le surnageant.
10. Laisser sécher le culot à l'air libre pendant 10 à 15 minutes.
11. Eluer l'ADN avec 20 µl d'H₂O (pH 8,0) ou du tampon Tris pH 8,5.
12. Laisser à température ambiante pendant 5 minutes si le fragment d'ADN fait ≤ 4 kb. Si le fragment fait entre 4-10 kb incuber à 50 °C pendant 5 minutes. S'il fait plus de 4 kb, incuber 10 minutes à 50°C.
13. Centrifuger à 13000 g pendant 30 secondes et prélever le surnageant contenant l'ADN.

6. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose (Protocole Nucleospin)

Matériel :

- NucleoSpin Extract kit (Marchery-Nagel)
- Bain chauffant thermostatisé à 50°C

Protocole:

1. Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose avec un scalpel propre.
2. Peser le gel dans un tube et ajouter 300 µl de tampon NT1 pour 100 mg de gel.
3. Incuber 10 minutes dans un bain à 50°C pour solubiliser l'agarose et mélanger toutes les 2 minutes.
4. Placer la colonne NucleoSpin extract dans un tube collecteur de 2 ml
5. Déposer l'échantillon dans le tube collecteur et centrifuger à 8000 g pendant 1 minute, puis vider le tube collecteur.
6. Ajouter 600 µl de tampon NT3 à la colonne puis centrifuger à 11000 g pendant 1 minute, puis vider le tube collecteur.
7. Ajouter 200 µl de tampon NT3 et centrifuger à 11000 g pendant 1 minute, puis éliminer le surnageant.
8. Faire préchauffer le tampon d'élution à 70°C.
9. Placer la colonne dans un eppendorf de 1,5 ml propre et ajouter 20 µl de tampon d'élution. Laisser 1 minute à température ambiante puis centrifuger à 11000 g.

7. Purification d'ADN sur colonne « microcon »

Matériel :

- Kit de purification microcon (Millipore)

Protocole :

1. Déposer sur la colonne x µl d'échantillon plus y µl d'eau. ($x + y = 450$ µl).
2. Centrifuger 15 minutes à 4300 g.
3. Rajouter 20 µl d'eau sur la colonne.
4. Laisser incuber 5 minutes à température ambiante.
5. Retourner le tube dans l'autre sens et le placer dans un nouvel eppendorf.
6. Centrifuger 5 minutes à 1400 g.
7. Conserver le tube contenant l'ADN à - 20 °C jusqu'à une utilisation ultérieure.

8. Extraction d'ARN par la méthode TriPure™ (Roche)

Matériel :

- Mortier, pilon et broyeur ultraturax préalablement traité au four pasteur à 180°C pendant une nuit.
- Tubes en polycarbonate de 30 ml autoclavés.
- Eau DEPC 0,1%
- Azote liquide

Protocole :

1. Culoetter les cellules en suspension par centrifugation à 190 g pendant 5 minutes à 4°C.

Ou

Prélever des plantules *Arabidopsis thaliana* cultivées en terre.

2. Plonger les plantules dans l'azote liquide et broyer les plantules dans l'azote liquide.
3. Ajouter 1 ml de Tripure par 200 mg de matériel frais ou congelé.
4. Homogénéiser le matériel végétal au fur et à mesure de la décongélation.
5. Récolter l'homogénat dans un tube de 30 ml et centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C.
6. Reprendre le surnageant dans un nouveau tube et laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante.
7. Ajouter 0,2 ml de chloroforme par ml de Tripure, mélanger par inversion pendant 15 sec et laisser reposer pendant 3 minutes à température ambiante. Centrifuger à 12000 g pendant 15 minutes à 4 °C.
8. Prélever la phase supérieure et ajouter 0,5 ml d'alcool isopropylique par ml de Tripure.
9. Mélanger par inversion pendant 15 sec et laisser 10 minutes à température ambiante. Centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes à 4 °C.
10. Eliminer le surnageant. Laver l'ARN avec 1 ml d'éthanol 75% (préparé avec de l'eau DEPC 0,1%). Centrifuger à 7500 g pendant 5 minutes à 4 °C.
11. Enlever le surnageant et sécher le culot à l'air libre.
12. Resuspendre le culot dans de l'eau DEPC (20 à 500 µl).
13. Stocker l'ARN à - 80 °C.

9. RT-PCR

1. Synthèse d'ADNc premier brin au départ d'ARN total

Matériel :

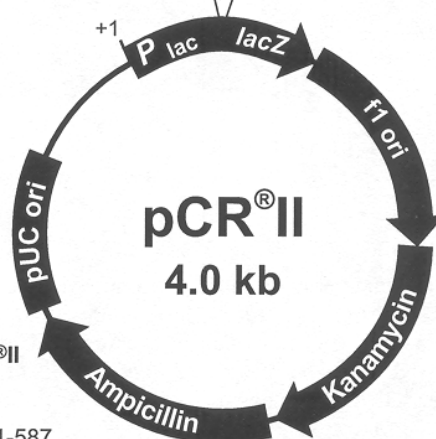
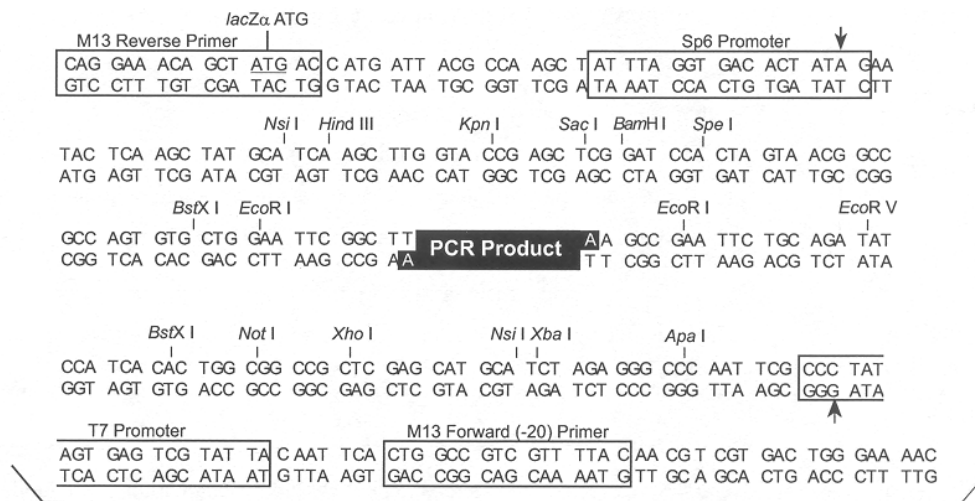
- Kit first strand cDNA synthesis (Amersham)
- Eau DEPC 0.1 %
- Bain chauffant thermostatisé à 37 °C.

Protocole:

1. Dans un eppendorf RNase-free mettre 1,5 µg d'ARN total d'*Arabidopsis thaliana* dans un volume maximal de 8 µl.
2. Incuber à 65 °C pendant 10 minutes et mettre immédiatement dans de la glace + eau.
3. Après refroidissement, centrifuger brièvement pour amener tout le liquide au fond du tube.
4. Ajouter 5 µl de bulk mix, 1 µl de DDT, 1 µl de Not primer dilué 25X.
5. Mélanger en pipetant et centrifuger brièvement.
6. Incuber à 37 °C pendant 1h.
7. PCR sur l'ADNc 1^e brin obtenu

Matériel :

- Bain chauffant thermostatisé à 90 °C.
- Appareil PCR (Biozym mini-cycler).
- Mix dNTP (Roche)
- Taq polymérase + tampon PCR (BioLabs).



Comments for pCR®II 3971 nucleotides

LacZα gene: bases 1-587
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-381
T7 promoter: bases 404-423
M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446
f1 origin: bases 588-1025
Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153
Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031
pUC origin: bases 3176-3849

8. Figure 2-1: Représentation schématique du vecteur pCRII® utilisé pour transformer des *E. Coli* Top10F'. Le vecteur contient le gène de la résistance à l'ampicilline et à la kanamycine et un site de clonage dans le gène LacZ ce qui permet de réaliser le test blanc/bleu.

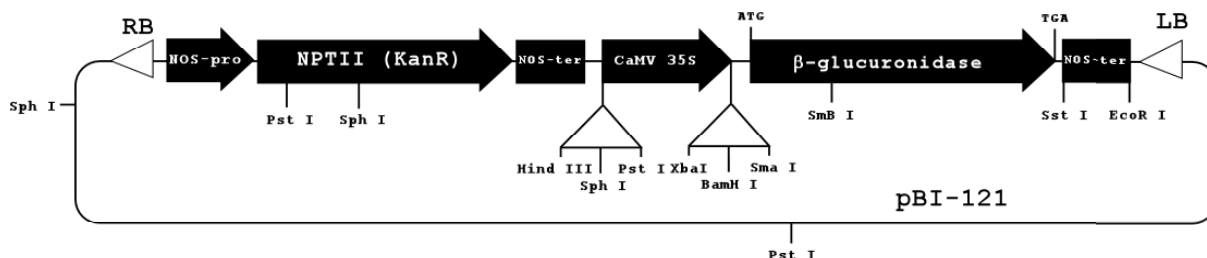


Figure 2-2 : Représentation schématique du vecteur binaire pBI121 utilisé pour transformer les plantes via *Agrobacterium tumefaciens*. Le T-DNA compris entre le bord droit (RB) et le bord gauche (LB) est transféré et inséré dans le génome de la plante lors de la transformation. Le T-DNA contient un gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur de la nopaline synthase (NOS pro, NOS-ter), le gène rapporteur GUS (β-Glucuronidase) sous le contrôle d'un promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV35S) et d'un terminateur NOS.

Protocole :

1. Chauffer l'ADNc à 90°C pendant 5 minutes et mettre immédiatement dans la glace + eau
2. Dans un tube PCR, mettre :
 - 5 µl d'ADNc.
 - 5 µl de tampon PCR.
 - 2 µl de dNTP (100 pmoles/µl).
 - 1 µl d'amorce gauche à 100 pmoles / µl
 - 1 µl amorce droite à 100 pmoles / µl
 - 35,5 µl d' H₂O
 - 0,5 µl de Taq polymérase (5 unités/µl)

2. Programme PCR de base :

Etape	Température	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation	94°C	5 min	1
Dénaturation	94°C	1 min	35
Hybridation	55°C	1 min	35
Elongation	72°C	3 min	35
	72°C	10 min	1

10. Réaction de ligation

Matériel :

- pCRII Cloning kit (Invitrogen)
- Vecteur pCRII (figure 2-1) ou Vecteur pBI121 (figure 2-2)
- Appareil PCR (Biozym mini-cycler)

Protocole :

1. Préparer 10 µl de réaction de ligation contenant :

- Produit PCR frais X µl
- Tampon ligation 10X 1 µl
- Vecteur (Z ng/µl) Z' µl
- Eau stérile pour un volume total de 10 µl
- T4 DNA ligase (4.0 unité Weiss) 1 µl

Remarque pour fixer x et z il faut calculer au préalable :

$$X \text{ ng produit PCR ou restreint} = \frac{(Y \text{ pb produit PCR}) * Z \text{ ng vecteur}}{(\text{Taille en pb du vecteur})}$$

2. Incuber la réaction de ligation à 14°C pendant une nuit.

11 Réaction de séquençage

Matériel :

- CEQ DTCS quick start kit
- CEQ Sequencing reaction buffer kit
- Stop solution : 1 µl de glycogène, 2 µl de d'acétate de sodium 3 M, 1,6 µl d'eau, 0,4 EDTA 0,5 M
- CEQ Sample loading solution (SLS)

Taille (Kbp)	ng pour 25 fnol	ng pour 50 fnol	ng pour 100 fnol
0.2	3.3	6.5	13
0.3	4.9	9.8	20
0.4	6.5	13	26
0.5	8.1	16	33
1.0	16	33	65
2.0	33	65	130
3.0	50	100	195
4.0	65	130	260
5.0	80	165	325
6.0	100	195	390
8.0	130	260	520
10.0	165	325	650
12.0	195	390	780
14.0	230	455	910
16.0	260	520	1040
18.0	295	585	1170
20.0	325	650	1300
48.5	790	1500	1500

Tableau 1: Tableau reprenant les quantités nécessaires de plasmide ou d'insert selon la taille de l'insert la cà séquencer

- SEQ sequencing separation buffer
- Séquenceur capillaire Beckman CEQ 8000

Protocole :

1. Préparer un mélange contenant 1 µl d'amorce (10 pmoles / µl), X µl d'ADN (à déterminer selon la taille du fragment, voir tableau 1). Ajuster le volume à 10 µl avec de l'eau stérile sans DEPC.
2. Dénaturer le mélange à 95 °C pendant 15 minutes puis mettre immédiatement sur glace pendant 3 minutes.
3. Rajouter 4 µl de CEQ DTCS quick start kit, 1 µl de CEQ Sequencing reaction buffer kit, 5 µl d'eau milliQ.
4. Lancer une réaction de séquençage avec le programme suivant :

1 X	92°C	1minutes 30 secondes
40 X	96°C	20 secondes
	50°C	20 secondes
	60°C	4 minutes
1 X	4°C	à l'infini
5. Après réaction de séquençage, ajouter 5 µl de Stop solution et 60 µl d'éthanol 96 % froid.
6. Centrifuger 15 minutes à 13 000 g puis éliminer le surnageant.
7. Laver avec 200 µl d'éthanol 76 %, centrifuger 15 minutes à 13 000 g et éliminer le surnageant. Refaire cette étape une seconde fois.
8. Sécher l'ADN au speedvac pendant 25 minutes.
9. Resuspendre dans 40 µl de SLS CEQ. Placer l'échantillon dans un puits et couvrir celui-ci avec une goutte d'huile minérale.

10. Prendre une nouvelle plaque 96 puits, et ajouter dans chaque puits 8 gouttes de SEQ sequencing separation buffer. Placer cette plaque et celle contenant les échantillons à l'endroit prévu dans l'appareil de séquençage.
11. Lancer la méthode de séparation LFR-a (CEQ 8000 Genetic analysis system) avec les paramètres suivants :
 - température des capillaires lors de la migration : 50°C
 - température de dénaturation 90°C pendant 120 secondes
 - injection : voltage 2 kV pendant 15 secondes
 - Séparation voltage 4 kV pendant 110 minutes
12. Analyser les séquences avec les paramètres d'analyse par défaut.

E. Méthode relative à la transformation des végétaux

1. Transformation de cellules végétales cultivées en suspension

Matériel

- Milieu de culture de L-MM1 ou A-TL (voir page 1-2).
- Milieu de callogenèse de L-MM, A-TL (voir page 1-2).
- Solution d'acétosyringone fraîchement préparer (stock : 100 mM)

Protocole :

1. Lancer une culture de 5 ml d'*Agrobacterium* dans du milieu LB 25 µg/ml streptomycine, 10 µg/ml rifampicine, 20 µg/ml gentamycine et 10 µg/ml kanamycine.
2. Quatre à huit heures avant la transformation, ajouter l'acétosyringone à la culture d'*Agrobacterium* à une concentration final de 100 µM.
3. Mesurer la DO₅₅₀ de la culture d'*Agrobacterium* et ajuster à 1,0.
4. Centrifuger 2150 µl de bactéries à 13000 g et les resuspendre dans 2 150 µl de milieu BM.
5. Rajouter les bactéries à une culture d'*Arabidopsis* fraîchement repiquée ainsi que l'acétosyringone à une concentration finale de 100 µM.
6. Co-cultiver les cellules en suspension avec les *Agrobacterium* pendant 48h.
7. Ajouter 150 mg/l [soit 3 ml/l d'un stock 50 mg/ml] de Céfotaxime et de Ticarcilline acide clavulanique pour éliminer les *Agrobacterium*
8. Repiquer la culture en suspension une semaine après la transformation et suivre le protocole de repiquage habituel (voir page 18)
ou
9. Collecter dans un Falcon de 50 ml les cellules infectées par *Agrobacterium* par centrifugation à 1000 g pendant 3 minutes à 4 °C.
10. Laver 2X le culot de cellules avec une solution de sucrose 3 %.
11. Resuspendre les cellules transformées dans une solution de sucrose 3,0 % + gelrite 0,2 % maintenue à 45 °C et couler l'ensemble sur du milieu CM + kanamycine.

III. Résultats

Résultats

Voici un bref rappel de la technique que nous allons utiliser pour contribuer à l'étude de l'interaction de Wak1 avec un des constituants majeurs de la paroi : la pectine. Cette technique est inspirée d'une technique utilisée par He et al. (2001) pour mettre en évidence l'activation de bri1 par un brassinostéroïde. Elle consiste à construire un récepteur hybride formé, d'une part, du domaine extracellulaire du récepteur testé et, d'autre part, du domaine kinase d'un récepteur dont on connaît l'activité. Dans notre cas, nous avons choisi le domaine kinase de bri1. Le récepteur hybride Wak1-bri1 sera construit sur le même modèle que NRG 1, le récepteur hybride bri1-Xa21 fonctionnel de He (He et al. 2001). Le récepteur NRG 1 était composé des domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de bri1 et du domaine kinase de Xa21. Le récepteur hybride que nous voulons construire contiendra le domaine extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de Wak1 que nous appellerons désormais domaine extracellulaire de Wak1 et le domaine kinase de bri1.

A Définition des amorces PCR

1. Analyse in silico de Wak1 et Bri1

Dans un premier temps, nous avons recherché les séquences des gènes *Wak1* et *bri1* dans la banque de données NCBI. À partir de ces séquences, une recherche de la position des différents domaines protéiques a été effectuée dans the TIGR *Arabidopsis thaliana* Database.

Séquence *Wak1* (At1g21250) (figure 1)

Le domaine extracellulaire : 1 aa à 332 aa

Les domaines EGF : 238 aa et 328 aa

Le domaine transmembranaire : 333 aa à 355 aa

Le domaine juxtamembranaire : 356 aa à 371 aa

Le domaine kinases : 409 aa à 682 aa.

Séquence *bri1* (At4g39400) (figure 1)

Le domaine extracellulaire : 1 aa à 792 aa

Le domaine transmembranaire : 793 aa à 814 aa

Le domaine juxtamembranaire 815 aa à 882 aa

Le domaine kinases : 883 aa à 1155 aa

Nous voulons assembler les domaines protéiques de Wak1, compris entre l'acide aminé 1 et 371, au domaine kinase de bri1, compris entre l'acide aminé 883 et 1155. Pour pouvoir assembler la séquence codant pour le domaine extracellulaire de Wak1 avec celle codant pour le domaine kinase de bri1, il nous faut rajouter un site de restriction. Ce site doit être absent du domaine extracellulaire de Wak1 ou du domaine kinase de bri1 et du vecteur de clonage. En plus de ce site, deux autres sites de restriction doivent être introduits pour le clonage du fragment hybride Wak1-bri1 dans le vecteur de transformation de plante. De nouveau, ces sites doivent être absents du domaine extracellulaire de Wak1 et du domaine kinase de bri1.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché les sites de restriction uniques présents dans ces différentes séquences codantes avec le programme DNA strider.

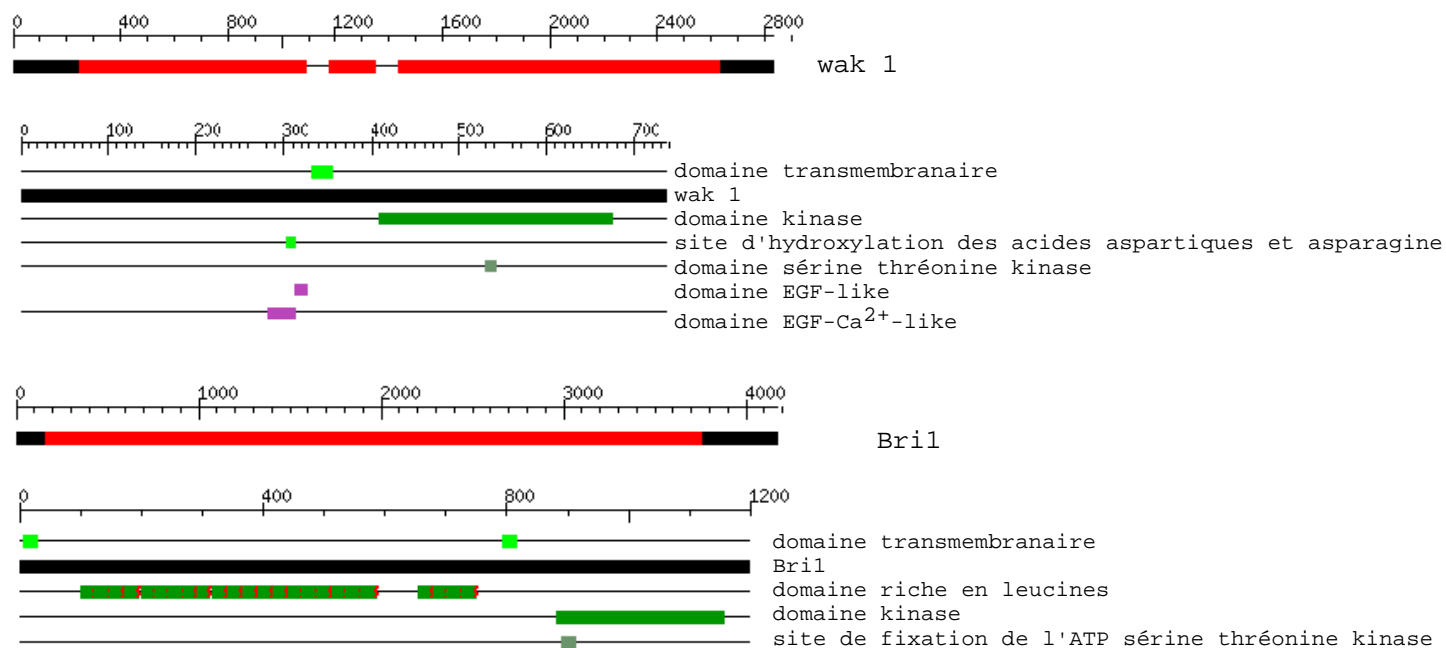


Figure 1 : Représentation schématique de la localisation des différents domaines de Wak1 et de bri1.

Site de restriction absent de la séquence wak 1 :

Acc65 I	g/gtacc	Dra III	cacnnn/gtg	Nhe I	g/ctagc
Age I	a/ccggt	Drd I	gacnnnn/nngtc	Not I	gc/ggccgc
Apa I	gggcc/c	Dsa I	c/crygg	Nru I	tcg/cga
ApaL I	g/tgcac	Eag I	c/ggccg	Nsi I	atgca/t
Asc I	gg/cgcgcc	Eam1105 I	gacnnn/nngtc	Pac I	ttaat/taa
Ase I	at/taat	Eco47 III	agc/gct	PaeR7 I	c/tcgag
Ava I	c/ycgrg	EcoO109 I	rg/gnccy	PflM I	ccannnn/ntgg
Ava II	g/gwcc	EcoR I	g/aattc	Pme I	gttt/aaac
Avr II	c/ctagg	Ehe I	ggc/gcc	Pml I	cac/gtg
Bbe I	ggcgc/c	Esp3 I	cgtctc 1/5	Ppu10 I	a/tgcat
Bbs I	gaagac 2/6	Fau I	cccgc 4/6	PpuM I	rg/gwccy
Bcl I	t/gatca	Fse I	ggccgg/cc	Psp1406 I	aa/cggt
Bgl I	gccnnnn/nggc	Fsp I	tgc/gca	Pvu I	cgat/cg
Bpm I	ctggag 16/14	Hae II	rgcgc/y	Rsr II	cg/gwccg
Bpull102 I	gc/tnagc	Hga I	gacgc 5/10	Sac II	ccgc/gg
Bsa I	ggtctc 1/5	Hha I	gcg/c	Sfi I	ggccnnnn/nggcc
BsaA I	yac/gtr	Hind III	a/agctt	SgrA I	cr/ccggyg
BsaW I	w/ccggw	HinP I	g/cgc	Sma I	ccc/ggg
BsiE I	cgrg/cg	Kas I	g/gcgcc	SnaB I	tac/gta
BsiW I	c/gtacg	Kpn I	ggtac/c	Srf I	gccc/gggc
Bsp120 I	g/ggcc	Mcr I	c/grycg	Sse8337 I	cctgca/gg
BspE I	t/ccgga	Mlu I	a/cgcgt	Stu I	agg/cct
BspM I	acctgc 4/8	Mun I	c/aattg	Swa I	attt/aaat
BsrF I	r/ccggy	Nae I	gcc/ggc	Tth111 I	gacn/nngtc
BssH II	g/cgcgc	Nar I	gg/cgcc	Xho I	c/tcgag
BstU I	cg/cg	Nco I	c/catgg	Xma I	c/ccggg
BstX I	ccannnn/ntgg	NgoM I	g/ccggc		

Site de restriction unique de wak 1 :

Enzyme	Site	<--	Pos.	-->
Bsg I	gtgcag 16/14	6	7	2202
Bcn I	ccs/gg	159	160	2049
Nci I	cc/sgg	159	160	2049
Afl III	a/crygt	203	204	2005
Afl II	c/ttaag	209	210	1999
BspD I	at/cgat	268	269	1940
Cla I	at/cgat	268	269	1940
Apo I	r/aatty	335	336	1873
Hpa I	gtt/aac	362	363	1846
Bsm I	gaatgc 1/-1	409	410	1799
Sph I	gcatg/c	429	430	1779
AlwN I	cagnnn/ctg	457	458	1751
Sal I	g/tcgac	498	499	1710
Bcg I	cgannnnntgc	500	501	1708
BstB I	tt/cgaa	531	532	1677
PshA I	gacnn/nngtc	576	577	1632
Xmn I	gaann/nnttc	639	640	1569
Bgl II	a/gatct	641	642	1567
BspH I	t/catga	664	665	1544
Nde I	ca/tatg	734	735	1474
BsaB I	gatnn/nnatc	810	811	1398
Aat II	gacgt/c	843	844	1365
BsaH I	gr/cgyc	843	844	1365
Spe I	a/ctagt	861	862	1347
Sca I	agt/act	867	868	1341
Bst1107 I	gta/tac	1060	1061	1148
Sau96 I	g/gncc	1161	1162	1047
EcoN I	cctnn/nnnagg	1241	1242	967
Msc I	tgg/cca	1253	1254	955
Xba I	t/ctaga	1415	1416	793
Ban I	g/gyrcc	1461	1462	747
EcoR V	gat/atc	1599	1600	609
Ear I	ctcttc 1/4	1689	1690	519
Sap I	gctcttc 1/4	1689	1690	519
Ban II	grgcy/c	1692	1693	516
Ecl136 I	gag/ctc	1692	1693	516
Sac I	gagct/c	1692	1693	516
Dra I	ttt/aaa	1833	1834	375
Bsu36 I	cc/tnagg	2085	2086	123

Figure 2 : Analyse des sites de restriction unique présents et absents de wak 1. Les sites soulignés sont les sites de restriction choisis pour le clonage ultérieur.

Site de restriction absent de bril :

Acc I	gt/mkac	BssH II	g/cgcgc	Nhe I	g/ctagc
Acc65 I	g/gtacc	Bst1107 I	gta/tac	Not I	gc/ggccgc
Afl II	c/ttaag	BstB I	tt/cgaa	Nru I	tcg/cga
AlwN I	cagnnn/ctg	BstE II	g/gtnacc	Nsi I	atgca/t
Apa I	gggcc/c	BstX I	ccannnnn/ntgg	Pac I	ttaat/taa
ApaL I	g/tgcac	Dra III	cacnnn/gtg	PflM I	ccannnn/ntgg
Asc I	gg/cgcgcc	Drd I	gacnnnn/nngtc	Pml I	cac/gtg
Ase I	at/taat	Eag I	c/ggccg	Ppu10 I	a/tgcat
Avr II	c/ctagg	Eam1105 I	gacnnn/nngtc	Pvu I	cgat/cg
BamH I	g/gatcc	Eco47 III	agc/gct	Pvu II	cag/ctg
Ban I	g/gyrcc	EcoN I	cctnn/nnnagg	Sal I	g/tcgac
Bbe I	ggcgc/c	Ehe I	ggc/gcc	Sap I	gctcttc 1/4
Bcl I	t/gatca	Fau I	cccgc 4/6	Sfi I	ggcnnnn/nggcc
Bgl I	gccnnnn/nggc	Fse I	ggccgg/cc	SnaB I	tac/gta
BsaA I	yac/gtr	Fsp I	tgc/gca	Spe I	a/ctagt
BsaB I	gatnn/nnatc	Hae II	rgcgc/y	Sph I	gcatg/c
Bsg I	gtgcag 16/14	Kas I	g/gcgcc	Srf I	gccc/gggc
BsiW I	c/gtacg	Kpn I	ggtac/c	Sse8337 I	cctgca/gg
Bsm I	gaatgc 1/-1	Mlu I	a/cgcgt	Ssp I	aat/att
Bsp120 I	g/ggccc	Nae I	gcc/ggc	Stu I	agg/cct
Bsp1407 I	t/gtaca	Nar I	gg/cgcc	Swa I	attt/aaat
BspE I	t/ccgga	Nco I	c/catgg	Tth111 I	gacn/nngtc
BspH I	t/catga	Nde I	ca/tatg	Xcm I	ccannnnn/nnntgg
BspM I	acctgc 4/8	NgoM I	g/ccggc		

Site de restriction unique de bril:

Enzyme	Site cible		<--	Position	-->
Xba I	t/ctaga	387	388	3255	
EcoO109 I	rg/gnccy	404	405	3238	
PpuM I	rg/gwccy	404	405	3238	
Sty I	c/cwwgg	428	429	3214	
Sma I	ccc/ggg	486	487	3156	
Xma I	c/ccggg	486	487	3156	
EcoR I	g/aattc	545	546	3097	
Aat II	gacgt/c	642	643	3000	
BsaH I	gr/cgyc	642	643	3000	
Xmn I	gaann/nnttc	899	900	2743	
SgrA I	cr/ccgyg	908	909	2734	
Sca I	agt/act	1103	1104	2539	
Psp1406 I	aa/cgtt	1178	1179	2464	
Rsr II	cg/gwccg	1208	1209	2434	
Hpa I	gtt/aac	1568	1569	2074	
SfaN I	gcatc 5/9	2027	2028	1615	
EcoR V	gat/atc	2064	2065	1578	
BspD I	at/cgat	2190	2191	1452	
Cla I	at/cgat	2190	2191	1452	
BstN I	cc/wgg	2277	2278	1365	
EcoR II	/ccwgg	2277	2278	1365	
Dsa I	c/crygg	2301	2302	1341	
NspB II	cmg/ckg	2301	2302	1341	
Sac II	ccgc/gg	2301	2302	1341	
PshA I	gacnn/nngtc	2362	2363	1280	
Bcg I	cgannnnnntgc	2516	2517	1126	
Mun I	c/aattg	2537	2538	1105	
Bpm I	ctggag 16/14	3160	3161	482	
BsiE I	cgry/cg	3432	3433	210	
Mcr I	c/grycg	3432	3433	210	
Hae I	wgg/ccw	3454	3455	188	
Msc I	tgg/cca	3454	3455	188	

REMARQUE : **SacI** a trois sites de restrictions situé à : 812 - 1451 - 1667 nucléotides

Figure 3 : Liste des sites de restrictions absents et uniques de bri1. Les enzymes soulignées sont celles qui ont été choisies pour le clonage ultérieur


```

      . 250      . 260      . 270      . 280      . 290      . 300
VGSTSIICGGNSTCLDSTPRNGYICRCNEGF DGNPYLSAGCQDVNECTTSSTIHRHNCSDP
helix
sheet   EE           EE           EEEEE           EE           E
turns   TTT  TTTTTTT  T  TTTTT  TTTTT  TTTTTTTTT  TTTTTTT  TTTTTTT
coil    CC                      C

      . 310      . 320      . 330      . 340      . 350      . 360
KTCRNKVGGFYCKCQSGYRLDTTMSCKRKEFAWTTILLVTTIGFLVILLGVACIQQRMK
helix
sheet   EE           EEE           E           EEEEEEEEEEEEE
turns   TT  TTTTT  TTTTTTTTTT  TT           T
coil

      . 370      . 380      . 390      . 400      . 410      . 420
HLKDTKLRECFEQQNGGMLTQRLSGAGPSNVDVKIFTEDGMKKATNGYAESRILGQGGQ
helix  H HHHHHHHHHHHH           HHHHHHHHHH
sheet
turns   TTTT           T           TTT
coil    C           CC           C CCCCC           CCCCC           CCC

```

Figure 4 : Représentation schématique de la structure secondaire de Wak1 au niveau du domaine transmembranaire (analysé par le logiciel GOR Secondary Prediction from SBDS).

```

      . 730      . 740      . 750      . 760      . 770      . 780
AMSALTMLTEIDLNNLSGPIPEMGQFETFPAPKFLNNPGLCGYPLPRCDPSNADGYAH
helix  HHHHHHHHHHHH
sheet
turns   TTT           TT           TTTTTT  TTTT           TT  TTTTTT
coil    CC  CCCCCC  CCCCC  C

      . 790      . 800      . 810      . 820      . 830      . 840
HQRSHGRRPASLAGSVAMGLLFSFVCIFGLILVGREMRKRRRKKEAELEMYAEGHGNSGD
helix
sheet  E           E EEEE  EEEEEEEEE
turns  TTTTT  T           TT           TTTT           TT  T
coil    CCC CC C           C           CCCCC

      . 850      . 860      . 870      . 880      . 890      . 900
RTANNTNWKLTGVKEALSINLAAFEKPLRKLTADFLLQATNGFFHNDSLIGSGGFGDVYKA
helix
sheet  E           E           EEEEE
turns  TT           TT  T  TTT
coil  CCCCCC  CCC           CCC  CC C  CCCC

```

Figure 5 : Représentation schématique de la structure secondaire de Bri1 au niveau du domaine kinase (analysé par le logiciel GOR Secondary Prediction from SBDS).

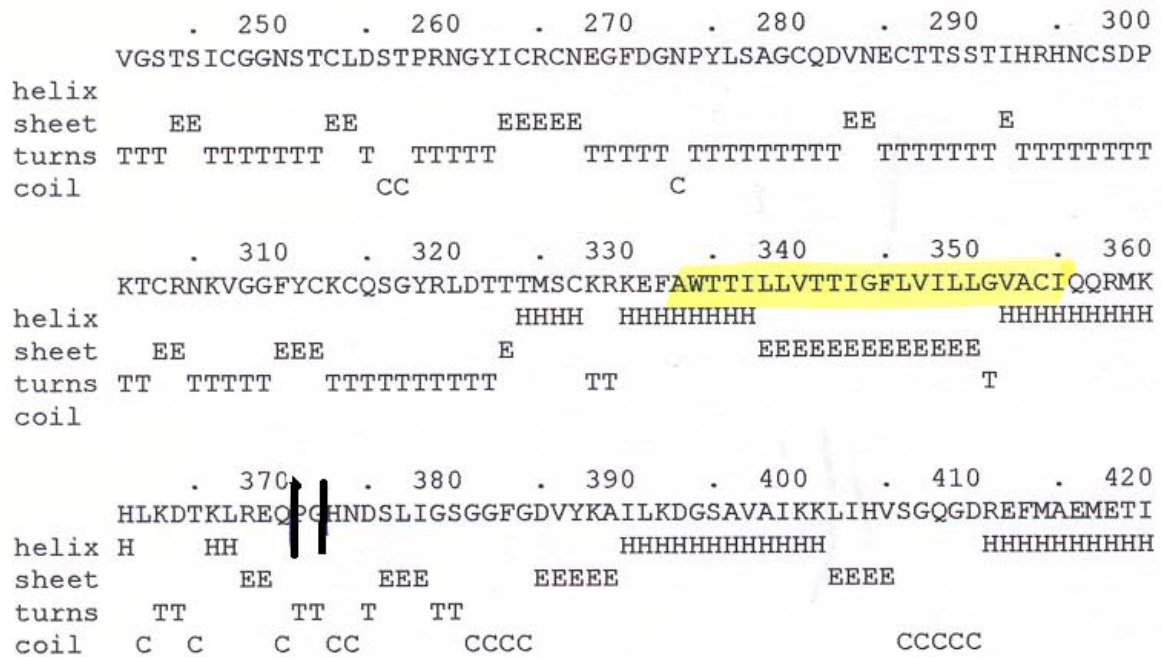


Figure 6 : Représentation schématique de la structure secondaire de Wak1-bri1 au niveau du domaine transmembranaire (analysé par le logiciel GOR Secondary Prediction from SBDS).

A partir des résultats obtenus (figures 2-3), le site de restriction que nous avons décidé d'ajouter pour permettre l'assemblage des fragments Wak1-bri1 est le site de restriction de l'enzyme SmaI (CCC↓GGG). Ce site est absent du vecteur de clonage pCRII®, et facilitera les étapes de clonage ultérieures.

Les sites de restriction que nous pouvons utiliser pour l'insertion dans pBI121 sont les suivants : XbaI, BamHI et SmaI pour le côté 5'; et SstI (SacI) pour le côté 3'. Vu que SmaI est déjà utilisé pour l'assemblage des fragments Wak1-bri1, seuls XbaI ou BamHI peuvent être utilisés. D'après les résultats obtenus dans la figure 3, nous avons choisi le site de restriction de XbaI (T ↓ CTAGA) car il est absent de la séquence codant pour le domaine extracellulaire de Wak1 et le domaine kinase de bri1.

Le site SstI sera ajouté du côté 3' de la séquence codant pour le domaine kinase ; ce site de restriction est absent dans la séquence codante du domaine kinase de bri1.

Maintenant que nous avons défini les sites de restriction à insérer, nous allons comparer la structure secondaire de Wak1 et de bri1 à celle du récepteur hybride théorique. La structure secondaire de Wak1 (figure 4) présente au niveau de la zone de jonction (371° aa) une hélice α allant du 351° au 374° aa. Au niveau de la zone de jonction du récepteur hybride, on constate que l'hélice α ne va que jusqu'au 371° aa (figure 5). La structure secondaire du domaine kinase (figure 6) du récepteur hybride (à partir du 373° aa) ressemble évidemment à celle présente au niveau du domaine kinase du récepteur bri1 (883° aa).

Malgré la petite modification observée dans la structure secondaire du récepteur hybride, nous décidons néanmoins d'aller plus loin et de définir les amorces qui nous permettront de cloner les différents fragments de Wak1 et de bri1.

2. Définition des amorces PCR Wak1 et bri1

Sur base de la séquence théorique obtenue par NCBI, des amorces gauche et droite permettant l'amplification du fragment de Wak1 et de bri1 respectivement ont été définies :

VanWak1g → 5' TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG 3'

VanWak1d → 5' CCCGGGTTGTTCTCGGAGCTTGGTGTC 3'

Vanbri1g → 5' CCCGGGCATAATGATAGTCTGATTGGT 3'

Vanbri1d → 5' GCGGCCGCGAGCTCTCATAATTTTCCTTCAGGAAC 3'

Ces amorces ont été définies de telle manière à conserver le cadre de lecture.

B. Clonage du domaine extracellulaire de Wak1 dans pCRII®

Le laboratoire avait auparavant isolé et cloné la séquence codante du gène Wak1 dans le vecteur pCRII®. Nous sommes partis de ce clone bactérien pour isoler le plasmide Wak1-pCRII® par miniprep. L'ADN plasmidique préparé a servi de matrice pour amplifier la partie du gène Wak1 qui nous intéresse et de rajouter à ce fragment les deux sites de restriction que nous avons déterminé au point 1 : XbaI et SmaI. Cette amplification a été réalisée au moyen des amorces VanWak1d et VanWak1g en utilisant les conditions suivantes :

- Température de dénaturation : 95 °C pendant 1 minute
- Température d'*Hybridation* : 50 °C pendant 1 minute
- Température d'élongation : 72 °C
- 35 cycles un cycle
- 72 °C pendant 10 minutes
- 4 °C à l'infini

Nous avons ainsi amplifié un fragment de 1116 pb correspondant à la séquence codant pour le domaine de Wak1 défini au point 1 (figure 7). Avant d'être inséré dans pCRII®, le produit PCR a été déposé sur gel et le fragment de 1116 pb a été excisé du gel et purifié par la méthode QIAEX (figure 8). Ce fragment de 1116 pb a ensuite été inséré dans le vecteur pCRII® en testant différents rapports insert / vecteur.

Des bactéries *E. coli* Top 10f⁺ ont été transformées par choc thermique avec les différents produits de ligation. Les bactéries transformées ont été étalées sur milieu LB sélectif (Amp, IPTG, X-Gal) et incubées à 37°C pendant une nuit. Un criblage préliminaire des transformants par un test blanc/bleu a été réalisé.

Pour identifier les colonies blanches qui ont intégré l'insert Wak1 dans le vecteur pCRII®, une PCR a été réalisée avec les amorces VanWak1d et VanWak1g afin d'amplifier l'insert de 1116 pb (figure 9). Un clone s'est avéré être positif au terme de ce criblage. Pour confirmer les résultats obtenus par PCR, plusieurs restrictions diagnostiques ont été réalisées.

Nous avons effectué cette vérification au moyen des enzymes de restriction SmaI, XbaI et EcoRI. L'enzyme EcoRI coupe au niveau de deux sites de restriction situés sur le

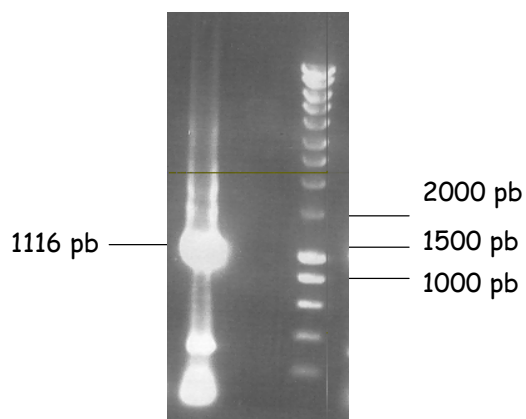


figure 7 : Vérification sur gel d'agarose 1 % de l'amplification du fragment Wak 1 correspondant aux domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire.

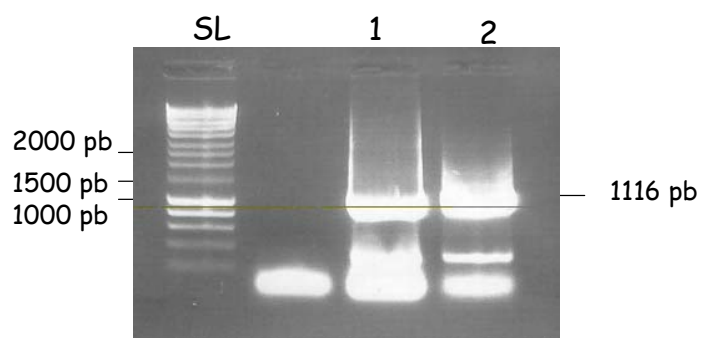


figure 8 : Migration sur gel d'agarose 1 % de l'amplification du fragment wak 1 extracellulaire (1116 pb). La bande à 1116 pb a été découpée du gel en vue d'une purification avec le kit QIAEX

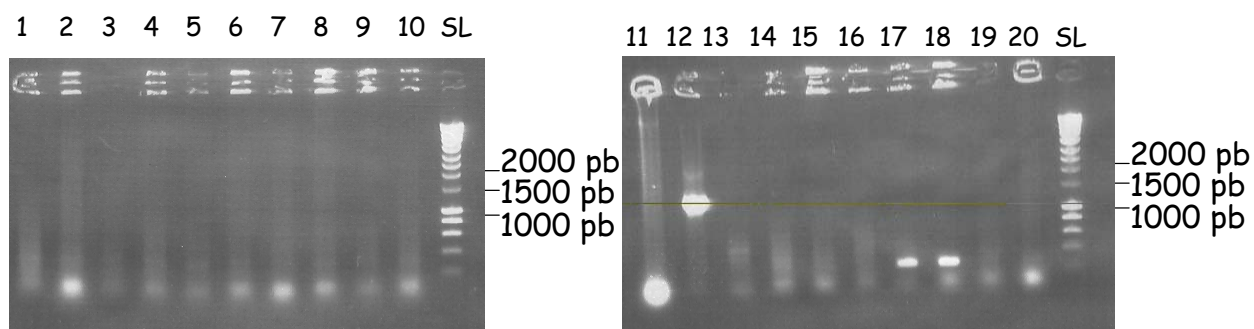


figure 9 : Criblage PCR des colonies transformées avec Wak 1-pCRII avec les amorces vanwakd et vanwakg analysé sur gel d'agarose 1 %. le clone 12 est positif.

Erreur ! Liaison incorrecte.

vecteur de part et d'autre de l'insert. L'enzyme XbaI coupe aussi au niveau de deux sites de restriction, un sur l'insert et l'autre sur le vecteur. pCRII ne possédant pas de site SmaI, le seul site de restriction SmaI sera celui présent au niveau de l'insert.

Les restrictions ont été réalisées à partir d'une minipréparation de plasmide du clone 12. (Figure 10). La restriction avec EcoRI permet de mettre en évidence un fragment d'environ 1100 pb et un d'environ 3900 pb. Les restrictions SmaI et XbaI présentent un fragment de 5 kb correspondant au vecteur linéarisé. Le deuxième fragment obtenu lors de la restriction avec XbaI est tellement petit, 51 pb, qu'il n'est pas visible sur le gel. Pour confirmer que le clone 12 contient l'entièreté du fragment Wak1 (domaine extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire), son insert a été séquencé au moyen des amorces forward et reverse du plasmide pCRII®. Les résultats obtenus à la sortie du séquenceur ont été analysés par Blastn. Nous avons pu vérifier que la séquence clonée était complète et que les amorces utilisées avaient introduit correctement les sites de restriction SmaI et XbaI en bordure de l'insert sans décalage de phase.

C. Clonage du domaine kinase de bri1 dans pCRII®

Au début de ce travail, cette séquence n'était pas disponible au laboratoire. Nous l'avons cloné au départ de mRNA par rétro-transcription. Pour cela, nous avons extrait de l'ARN total de plantules d'*Arabidopsis thaliana* selon la méthode d'extraction au Tripure™. Cet ARN total (figure 11) a été utilisé comme matrice pour une synthèse d'ADNc premier brin. Une PCR avec les amorces Vanbr1dr et Vanbr1lg sur l'ADNc premier brin a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Température de dénaturation : 95 °C pendant 1 minute
- Température d'hybridation : 50 °C pendant 1 minute
- Température d'élongation : 72 °C pendant 3 minutes
- 35 cycles un cycles
- 72 °C pendant 10 minutes
- 4 °C à l'infini

Un fragment d'environ 900 pb a ainsi été amplifié (figure 12). Vu la présence d'une bande parasite à 200 pb, le produit PCR a été déposé sur gel, le fragment de 900 pb a été découpé et purifié par la méthode QIAEX (figure 13).

Le fragment d'ADN correspondant au domaine bri1 a été inséré dans le vecteur pCRII® en testant différents rapports insert / vecteur. Des bactéries *E. coli* Top10f' ont été transformées par choc thermique avec les différents produits de ligation. Les bactéries transformées ont été étalées sur milieu LB sélectif (Amp, IPTG, X-Gal). Un criblage préliminaire des transformants par un test blanc/bleu a été réalisé.

Pour identifier les colonies blanches qui ont intégré un plasmide bri1-pCRII®, une PCR préliminaire a été réalisée avec des amorces forward et reverse en utilisant les mêmes conditions que pour l'amplification avec les amorces Vanbr1dr, Vanbr1lg. Trois clones présentant une amplification adéquate de 1200 pb (952 bp de l'insert plus 250 pb du vecteur) ont été sélectionnés (figure 14).

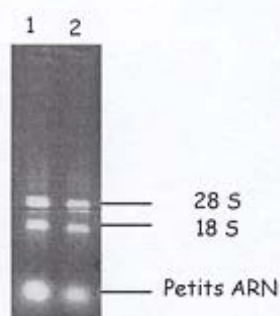


Figure 11: Vérification de l'intégrité d'ARN total extrait de plantules *Arabidopsis*.

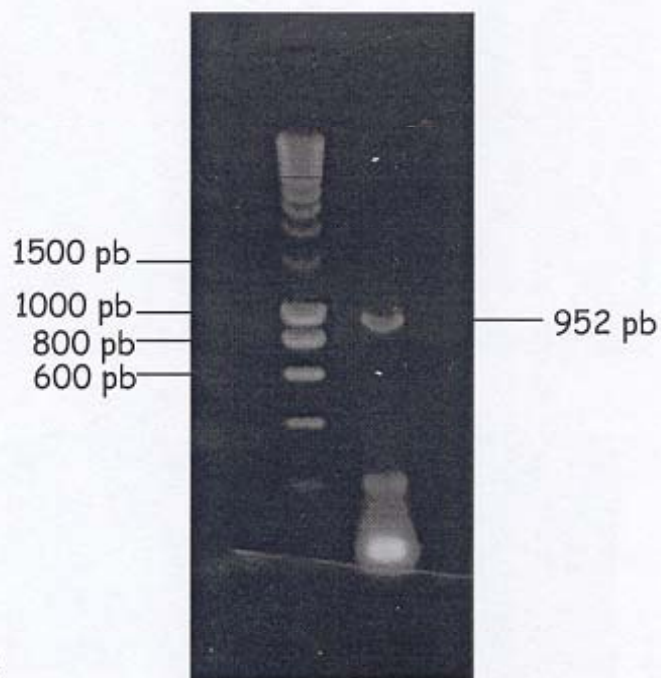


Figure 12: Vérification sur gel d'agarose 1 % de l'amplification à partir d'ADNc du fragment *bri1* correspondant au domaine kinase (952 pb).

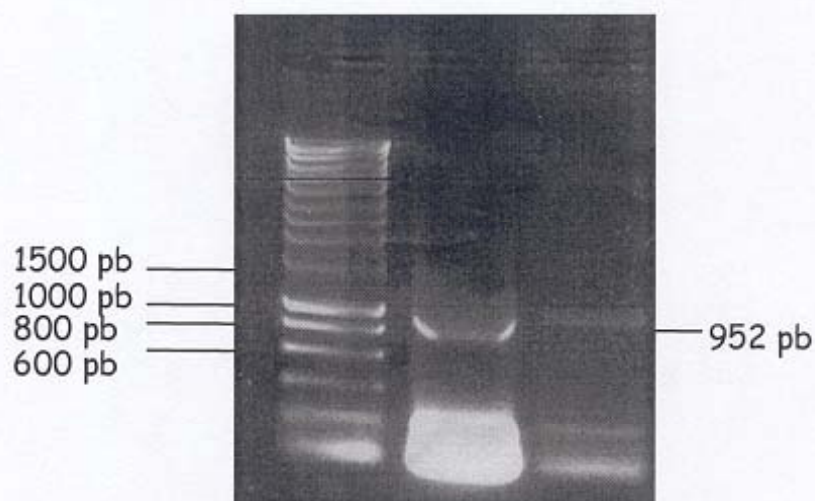


Figure 13 : Vérification sur gel d'agarose 1 % de l'amplification du fragment *bri1*. La bande de 952 pb a été découpée en vue d'une purification avec le kit QIAEX.

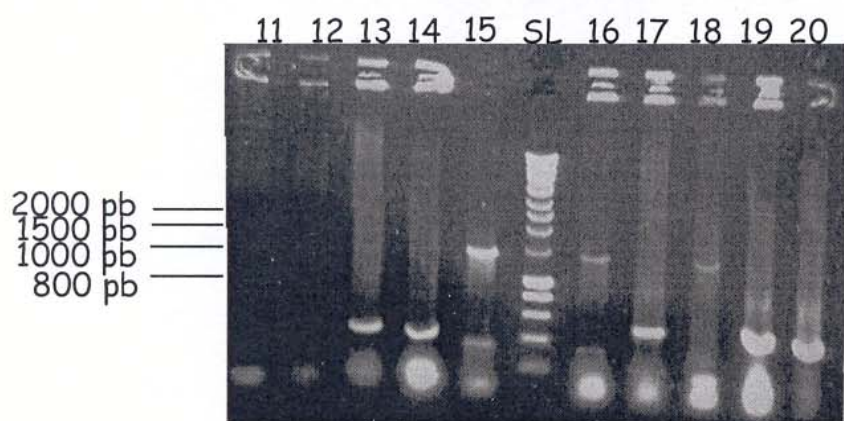
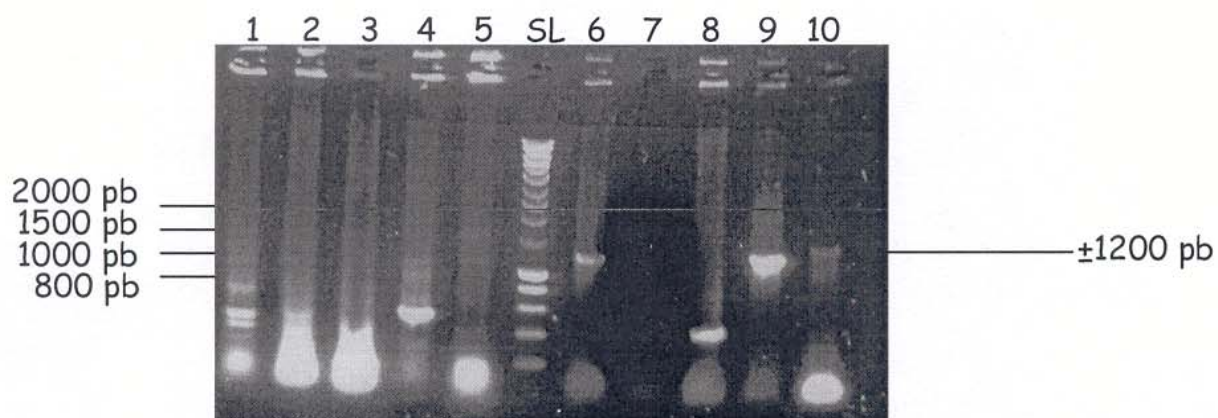


figure 14 : Criblage des colonies transformées avec le vecteur bri1-pCRII avec les amorces Forward et Reverse- analyse sur gel d'agarose 1 %. Les clones 6, 9, 10 sont positifs.

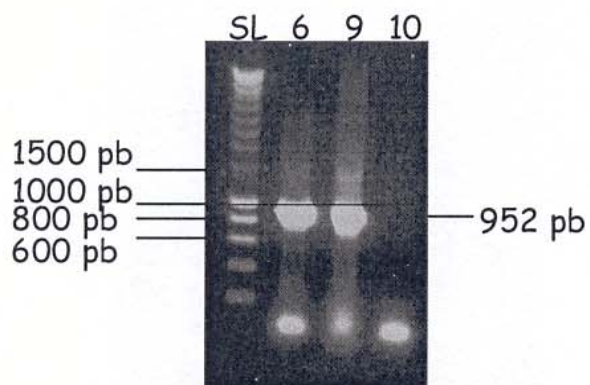


figure 15 : Criblage par PCR des clones 6, 9, 10 transformés avec pCRII avec les amorces Vanbrid et Vanbrig - Analyse sur gel d'agarose 1 %. Les clones 6 et 9 sont positifs ; le clone 10 est négatif.

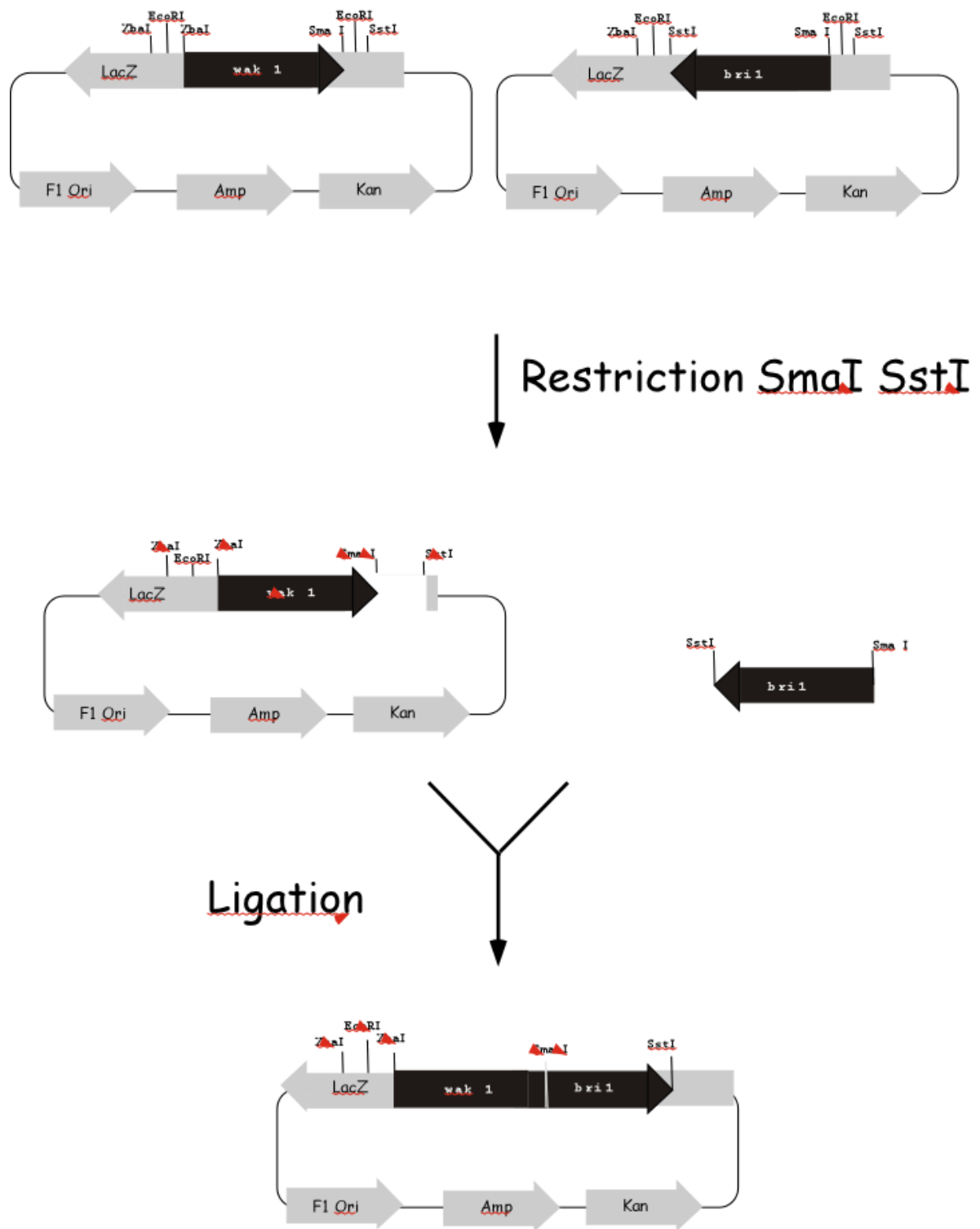


Figure 16: Restriction des plasmides wak1-pCRII et bri1-pCRII avec les enzymes de restriction *SmaI* et *SstI* suivie de la ligation de bri1 dans le vecteur wak1-pCRII.

Les clones sélectionnés par la première PCR ont été analysés avec les amorces Vanbri1d et Vanbri1g. Suite à ce criblage, seuls les clones 6 et 9 se sont avérés être positifs. Le clone 10 ne montre aucune amplification avec les amorces Vanbri1d et Vanbri1g (figure 15).

Pour confirmer les résultats obtenus par les PCR, plusieurs restrictions diagnostiques ont été réalisées avec les enzymes SmaI, SstI et EcoRI. L'enzyme EcoRI coupe au niveau de deux sites de restriction propres au vecteur situé de part et d'autre de l'insert. L'enzyme SmaI coupe en un seul site de restriction présent au niveau de l'insert. SstI coupe en deux sites proches, l'un sur le vecteur et l'autre sur l'insert.

Les restrictions ont été réalisées à partir d'une minipréparation de plasmide provenant des clones 6 ou 9. La restriction avec EcoRI a donné un fragment d'environ 970 pb et un d'environ 3900 pb. Les restrictions SmaI et SstI, quant à elles ont incontestablement linéarisé le vecteur et donnent un fragment de près de 5000 pb. La deuxième restriction SstI donne un petit fragment (42 pb) qui n'est pas visible sur le gel.

Afin de confirmer que les clones 6 et 9 contiennent l'entièreté du fragment Bri1, leur insert a été séquencé au moyen des amorces forward et reverse du plasmide pCRII®. Une analyse BLASTn montre un alignement correct de nos séquences avec les séquences codant pour le domaine kinase de bri1. De plus, nous avons pu vérifier que l'intégration était complète et que les sites de restriction Sma I et SstI étaient correctement introduits sans changement de phase.

D. Clonage du fragment Wak1-Bri1 dans pCRII®

Dans cette troisième étape, nous allons associer le fragment bri1 au fragment Wak1 dans pCRII. Pour cela, nous allons restreindre le plasmide Wak1-pCRII® et Bri1-pCRII® avec les enzymes SmaI et SstI (figure 16).

La restriction du plasmide Wak1-pCRII® restreint par SmaI et SstI donne un fragment d'environ 4900 pb et un fragment de 40 pb. Seul le fragment d'environ 4900 pb nous intéresse. Pour éliminer le petit fragment (40 pb) et les enzymes de restriction, une purification sur colonne microcon a été réalisée (figure 17).

La restriction du plasmide bri1-pCRII® par SmaI et SstI donne un fragment d'environ 900 pb et un fragment de plus ou moins 3900 pb (figure 18). Le produit de la restriction a été déposé sur gel d'agarose et la bande correspondant au domaine kinase de bri1 (900 pb) a été découpée et purifiée par QIAEX.

Le fragment de 900 pb correspondant au domaine kinase bri1 a été inséré dans le vecteur Wak1-pCRII® de 4900 pb en testant différents rapports insert / vecteur. Des bactéries *E. coli* Top10f⁺ ont été transformées par choc thermique avec les différents produits de ligation. Les bactéries transformées ont ensuite été étalées sur milieu LB sélectif (Amp). Vu que le fragment codant pour le domaine extracellulaire du gène Wak1 était déjà inséré dans le gène lacZ de pCRII, le criblage des transformants n'a pas été réalisé par un test blanc/bleu mais par PCR avec les amorces Forward et Reverse au moyen de l'Expand Polymérase vu la taille de l'insert recherché (soit 2300 pb). Les clones 1, 3, 4, 6, 8, 11, 13, 14, 17, 20 contiennent un fragment de plus de ± 2300 pb (figure 19).

Les clones 4, 6, 8, 11, 13 ont été analysés par PCR avec les amorces VanWak1g et Vanbri1d (figure 20). Tous les clones sélectionnés présentent un insert de 2058 pb. Les clones 4 et 8 ont été utilisés dans la suite du travail.

Pour le séquençage complet du fragment Wak1-bri1, de nouvelles amorces ont été déterminées sur base de la séquence théorique de Wak1-bri1 (figure 21). Ces amorces ont permis de couvrir toute la séquence de l'insert codant pour le récepteur hybride Wak1-bri1.

Les différentes séquences obtenues ont été analysées avec le programme vector NTI. Ce programme a permis de mettre en évidence les zones de chevauchement des différentes séquences et de reconstituer la séquence complète de l'insert Wak1-bri1. Cette séquence hybride a ensuite été analysée par Blastn montrant un alignement correct entre notre séquence hybride avec les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de Wak1 et le domaine kinase de bri1 respectivement.

E. Clonage du fragment Wak1-bri1 dans pBI121

A ce stade, nous avons le fragment Wak1-bri1 dans le vecteur pCRII®. Il nous faut maintenant insérer ce fragment dans le plasmide binaire pBI121 utilisé pour transformer les plantes via *Agrobacterium tumefaciens*.

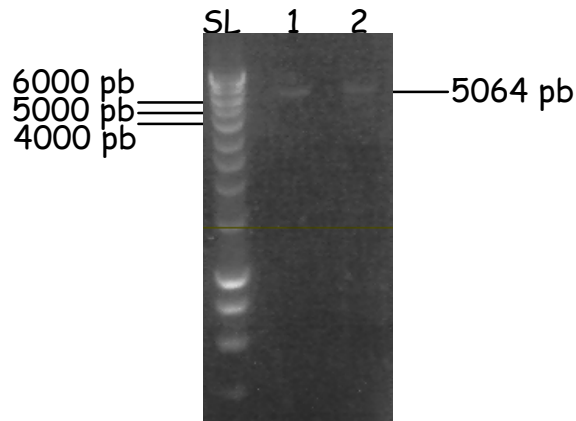


Figure 17: Vérification sur gel d'agarose 1 % de la restriction de wak_pCRII avec SmaI (1) et la double restriction par SmaI, SstI (2).

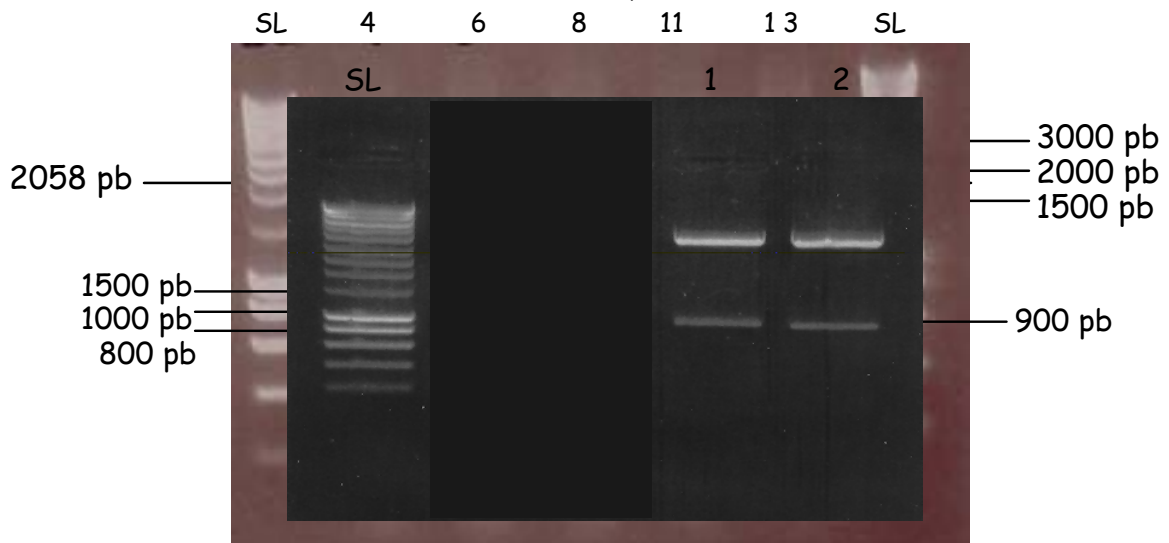


Figure 18 : Vérification de la double restriction SmaI, SstI des clones BRT6 (1) et BRT9 (2). La bande correspondant au fragment BRT (900 pb) a été découpée et analysée sur gel d'agarose 1 %. Les clones 4, 6, 8, 11, et 13 sont positifs.

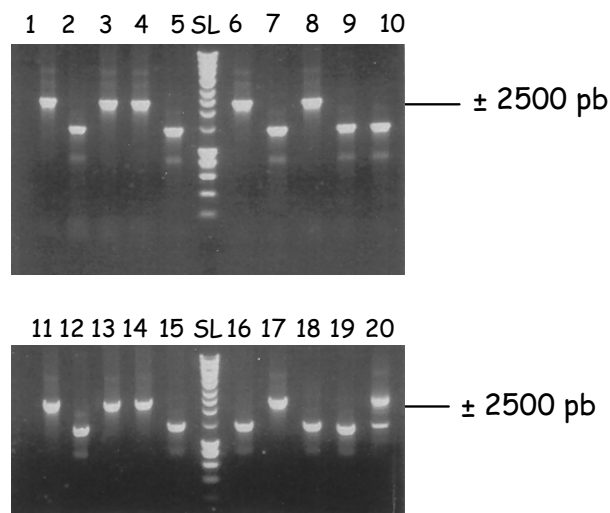


Figure 19 : Criblage des colonies transformées avec wak 1-bri1 pCRII avec les amorces Forward et Reverse - Analyse sur gel d'agarose 1 %. Les clones 1, 3, 4, 6, 8, 11, 13, 14, 17 sont positifs.

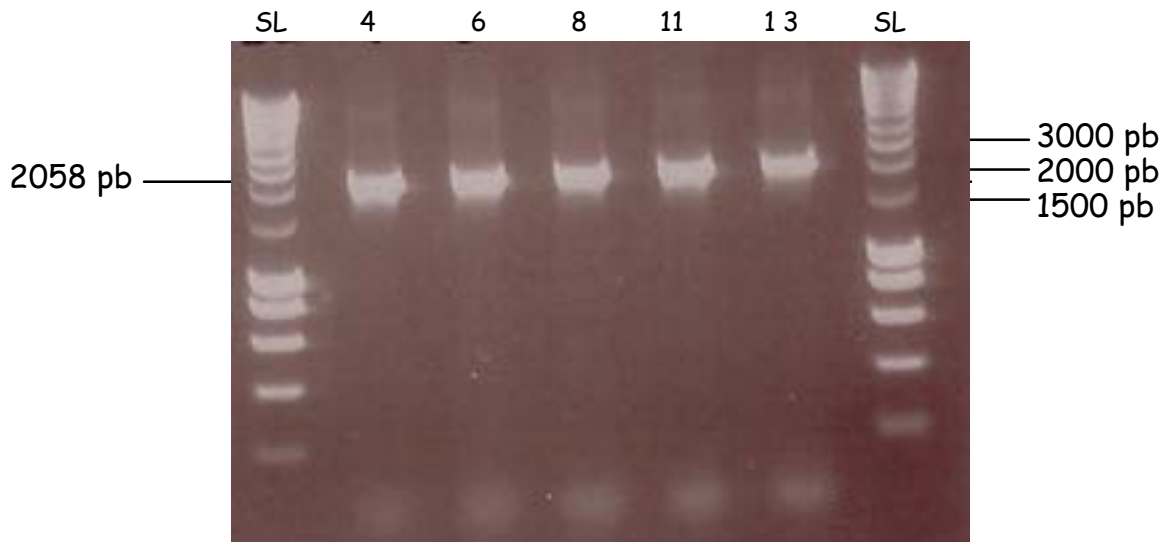


Figure 20 :Criblage des colonies wak 1- bri1 pCRII avec les amorces Vanbrid et vanwakg - Analyse sur gel d'agarose 1 %. Les clones 4, 6, 8, 11, 13 sont positifs.

```

TCTAGAAatgaaggtgcaggaggggttgccttgggtggctatcttctcccttgcgtgtacgcagctggtgaaggggcaacatcaa
cctgggtgagaattgccaaaataaatgtggcaacatcacatagagtacccctttggcatttcttcagggtgttactatcccggaaatga
aagtttcagttatcacctgtaaggaagataggccacatgtcttaagcgacattgaagtggcaaaccttaacacagcggccagctacaag
ttctgcttaatcgatcctctacttgcacgacgagcaaggaaaaaaactgaggaggacagttctttacactggaaaatttatctctt
tccgccaacaacaagtttaactgcagtaggctgtaacgctttatcacttctggacacttttggaaatgcaaaactactcaactgcatgctt
gtcattatgcatgattctccccagaggctgatggagaatgtaatggtagaggtgctgcagagtcgacgtttctgccccgttggatagct
atacattcgaaactacatcaggtcgcatcaagcacatgacttctttcacgacttttagtccttgacactacgcttttctcgttgaagatg
ataagttcaacttcagttctacagaagatcttctgaatctgcgaaatgtcatgaggttccctgtgttactagattggctgttggaaatc
agacatgcatgagcaagttggaagcacaagcatatgcggtgggaacagcacttgcctcgattctactcctagaaacgggtatatctgcag
atgcaatgaaggtttgatgggaatccatacctttcagctgggtgccaagacgtcaatgagtgtagtacttagtactatccatagac
ataactgttcggatcccaaacctgtagaacaaggttggaggttctattgtgaagtgtcaatctggttaccgcttagataccaccact
atgagctgcaagcgtaaagagtttgcattggactacaattcttctgtgaaccaccatcggttcttgggtcattctgcttggcgttgcctg
tatacaacagagaatgaagcacctgaaggacaccaagctccgagaacaaCCGGGcataatgatagctgattgggtctggtgggtt
tggagatgtttacaaagcgatgtttgaaagatggaagcgcggtggctatcaagaaactgattcatgttagcgggtcaaggtgatagagagt
tcatggcggagatggaaccattgggaagatcaaacatcgaaatcttgtgcctcttcttggttattgcaaagttggagacgagcggctt
cttgtgtatgagtttatgaagtatggaagtttagaagatgttttgcacgaccccaagaaagctggggtgaaactaaactggtccacacg
gcggaagattgcatagtagatcagctagagggttgccttcttaccacaaactgcagtcgcgcatatcatccacagagacatgaaatcca
gtaatgtgttgcctgatgagaatttggagctcgggtttcagattttggcatggcagggctgatgagtgcatggatacgcatttaagc
gtcagttacattagctggtacaccgggttacgttctccagagtattaccaaaagttcaggtgttcaacaaaaggagacgtttatagtta
cgggtgtggtcttactcgagctactcacgggtaaacggccaacggattcacgggttttggagataacaaccttgttggatgggtgaaac
agcacgcaaaactgcggttagcgatgtgtttgaccccgagcttatgaaggaagatccagcattagagatcgaaactttacaacattta
aaagttgcggttgcgtgtttggatgatcgggcttggagacgaccgacaatggtacaagtcatggccatgtttaaggagatacaagccg
ggtcagggatagattcacagtcacgatcagatcaatagaggatggaggggtcagtacaatagagatggttgatatgagtataaaaga
agttcctgaaggaaaattatgaGAGCTC

```

Figure 21 : Séquence théorique de wak1-bri1. Sept amorces ont été définies en vue du séquençage complet du récepteur hybride : VanWak1g, Wak1int1, Wak1int2, vanWak1d, vanbri1g, bri1int1, vanbri1d.

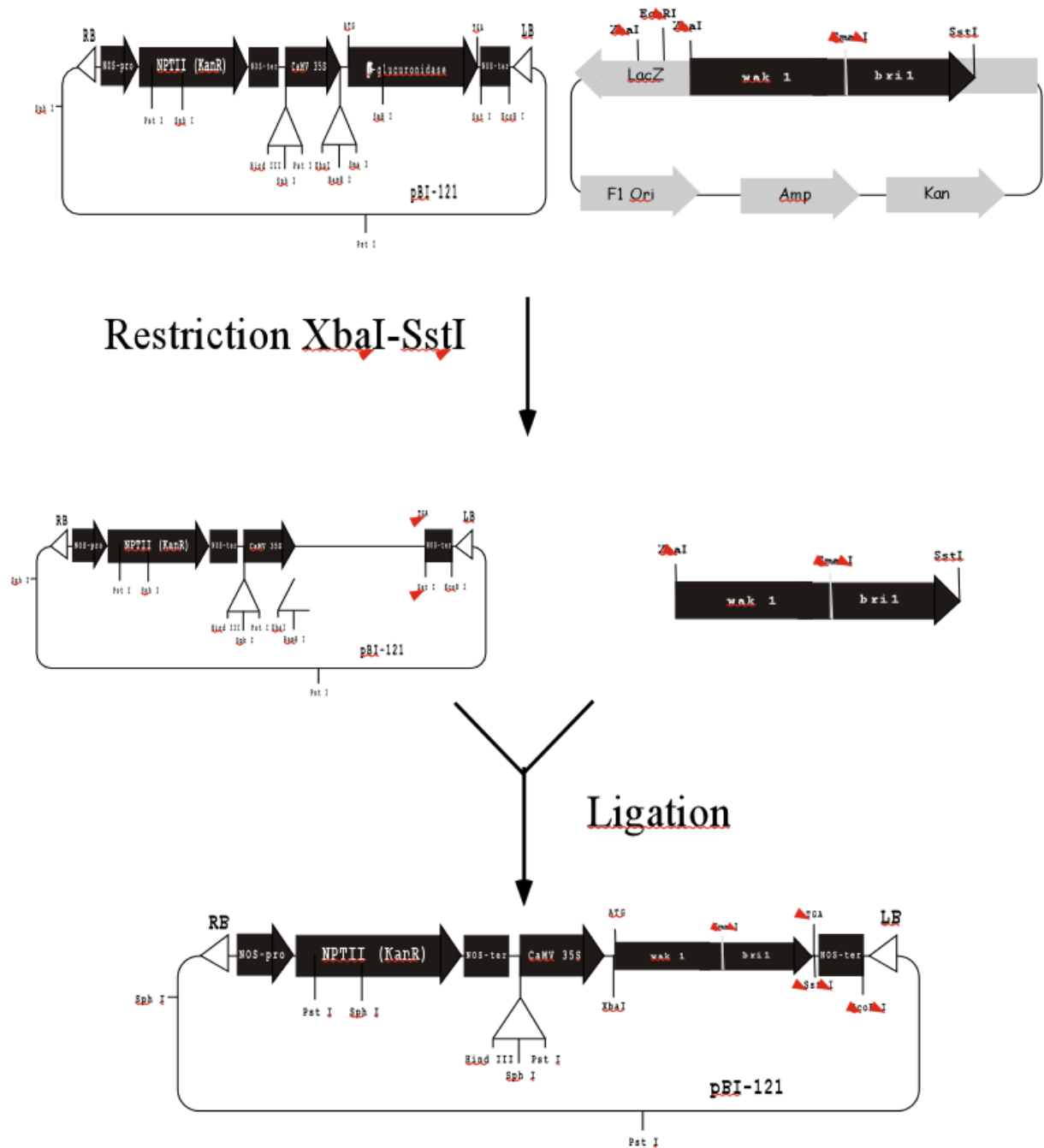


Figure 22: Restriction de pBI121 et de wak1-bril pCRII avec les enzymes de restriction *SstI* et *baI* suivit d'une ligation dans pBI121.

Pour rappel, le T-DNA de ce plasmide compris entre le bord droit (RB) et le bord gauche (LB) est transféré et inséré dans le génome de la plante lors de la transformation. Ce T-DNA contient un gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (NOS pro, NOS-ter) et le gène rapporteur GUS (β -Glucuronidase) sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du choux fleur (CaMV35S) et du terminateur NOS (figure 22).

Nous allons remplacer le gène GUS par le fragment Wak1-bri1. Pour cela, nous allons restreindre le plasmide Wak1-bri1-pCRII® et pBI121 avec les enzymes XbaI et SstI (figure 23).

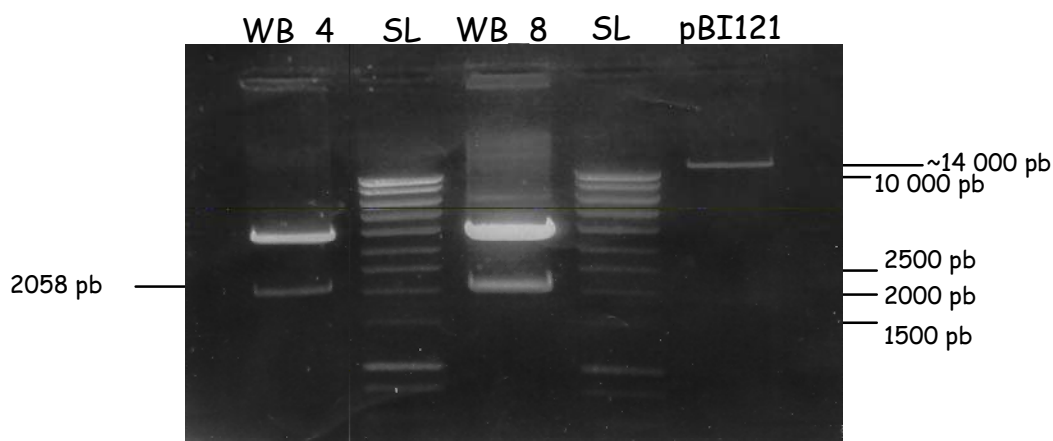


Figure 23 : Vérification sur gel d'agarose 1 % des restrictions XbaI, SstI des plasmides WB_4-pCRII, WB_8-pCRII et pBI121. Les bandes de 2058 pb et de 14 000 pb ont été découpées en vue d'une purification avec le kit QIAEX

Dans le cas de la restriction du plasmide Wak1-bri1 pCRII® par XbaI et SstI, on obtient un fragment de 2058 pb correspondant à Wak1-bri1 et un fragment d'environ 3900 pb correspondant au vecteur pCRII®. Le fragment Wak1-bri1 de 2058 pb a été extrait du gel et purifié par la technique QIAEX (figure 23).

Dans le cas de la restriction du plasmide pBI121 par XbaI et SstI, on obtient un fragment d'environ 900 pb contenant le gène GUS et un fragment d'environ 14000 pb contenant le plasmide pBI121 linéarisé. La bande correspondant au vecteur pBI121 dépourvu de GUS a été découpée du gel et purifiée par QIAEX (figure 23). Le fragment Wak1-bri1 a été inséré dans le vecteur pBI121 en testant différents rapport insert / vecteur. Des bactéries *E. coli* Top10f⁺ ont été transformées par choc thermique avec les différents produits de ligation. Les bactéries transformées ont été étalées sur milieu LB sélectif (Kan).

Les colonies bactériennes ont été criblées par PCR au moyen des amorces forward et reverse. Suite à cette procédure de ligation et de transformation, aucun clone possédant un insert de 2300 pb n'a été détecté. Plusieurs modifications dans la procédure de ligation et de transformation ont été envisagées.

Vu la taille importante du plasmide pBI121 (supérieure à 14 kb), nous avons remplacé la transformation par choc thermique par l'électroporation, plus efficace pour la transformation par de grands plasmides. Des concentrations plus importantes en pBI121 ont été également utilisées conjointement pour les mélanges de ligation. Ces nouveaux essais de transformation par électroporation n'ont donné aucun résultat positif.

Trois nouvelles modifications ont été apportées :

La ligase T4 d'Invitrogen (4.0 unité weiss) a été remplacée par une ligase plus efficace : la T4 DNA ligase de Biolabs (32 unité weiss).

Augmentation des quantités de plasmide pBI121 dans les réactions de restriction et de ligation.

Remplacement de la purification QIAEX par une purification plus efficace, le kit Nucléospin, pour la purification du plasmide pBI121.

Toutes ces modifications n'ont pas permis d'obtenir de clones positifs.

Une nouvelle modification a été apportée au protocole. Pour la restriction de Wak1-bri1 et de pBI121, nous avons remplacé les enzymes d'Invitrogen n'ayant qu'une efficacité de 65 % par des enzymes de New England Biolabs d'une efficacité de 95 % (Le pourcentage d'efficacité d'une enzyme correspond à la quantité de fragment qui peut se lier après digestion enzymatique). Une nouvelle ligation, suivie d'une transformation par électroporation a été réalisée. Le criblage des colonies bactériennes avec les amorces vanWak1g et vanbri1d a permis d'identifier deux clones positifs (figure 24). Les résultats du criblage PCR ont été confirmés par une restriction avec SstI et XbaI (figure 25). Les plasmides correspondants ont été utilisés pour la transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*.

F. Transformation de culture en suspension

La souche d'*Agrobacterium* utilisée dans ce travail, LBA4404/virG, est mutée pour le gène virG. Ce gène, impliqué dans le mécanisme d'intégration du T-DNA, est actif constitutivement et permet une meilleure efficacité de transformation. Les *Agrobacterium* LBA4404/virG rendues électrocompétantes ont été transformées par électroporation avec le plasmide Wak1-bri1 pBI121. Les bactéries transformées ont été étalées sur milieu sélectif (Kanamycine, gentamycine, rifampicine, streptomycine). Les bactéries se développant sur le milieu sélectif ont été utilisées pour la transformation de matériel végétal. La biologie de la transformation d'une plante par *Agrobacterium tumefaciens* est rappelée à la figure 26.

Le matériel végétal que nous avons choisi de transformer est une culture en suspension d'*Arabidopsis thaliana*. Ce choix se base essentiellement sur la facilité avec laquelle une telle suspension pourra par la suite être traitée avec divers éliciteurs (oligomères pectiques et aux PGA).

Rappelons rapidement les grandes étapes de la procédure de transformation des cultures en suspension par *Agrobacterium*. *Agrobacterium* a été préalablement traité avec de l'acétosyringone pour activer la transcription des gènes vir. La culture en suspension d'*A. thaliana* est ensuite infectée par *Agrobacterium* en présence d'acétosyringone. Après trois jours de co-culture, de la Céfotaxime et du Ticarcilline acide clavulanique ont été ajoutés à la culture en suspension. Ces antibiotiques servent à éliminer les *Agrobacterium* de la culture.

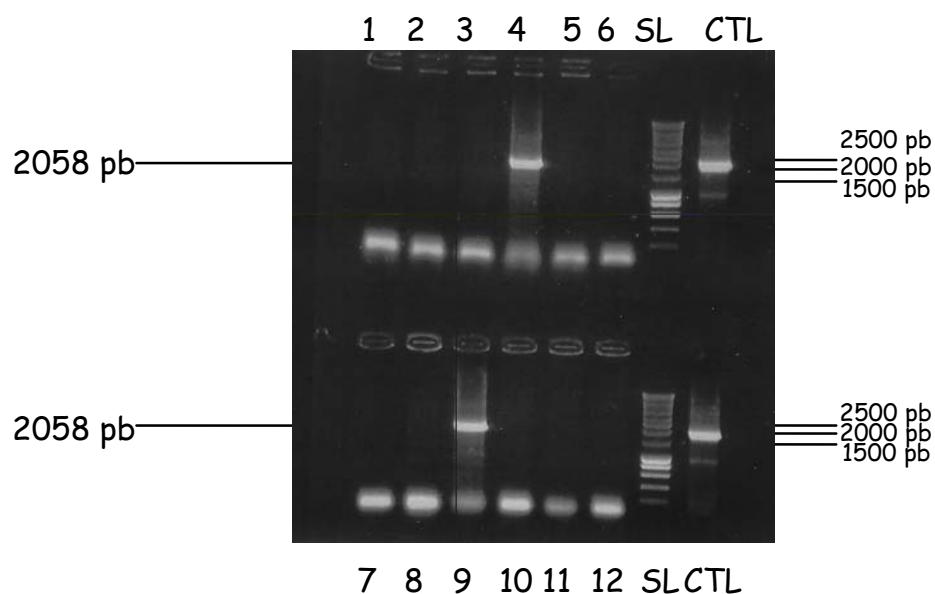


figure 24 : Criblage des colonies wak 1-bri pBI121 avec les amorces Wakd et Brig - Analyse sur gel d'agarose 1 %. Les clones 4, 9 sont positifs.

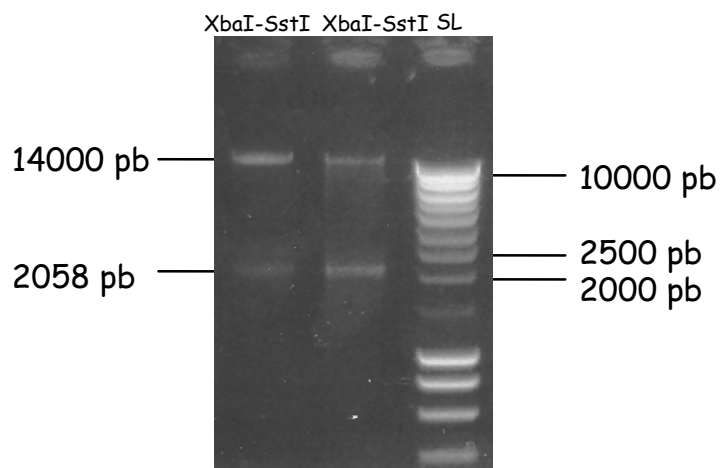


Figure 25 : Vérification sur gel d'agarose 1 % de la double restriction XbaI-SstI du plasmide wak1-bri1-pBI121

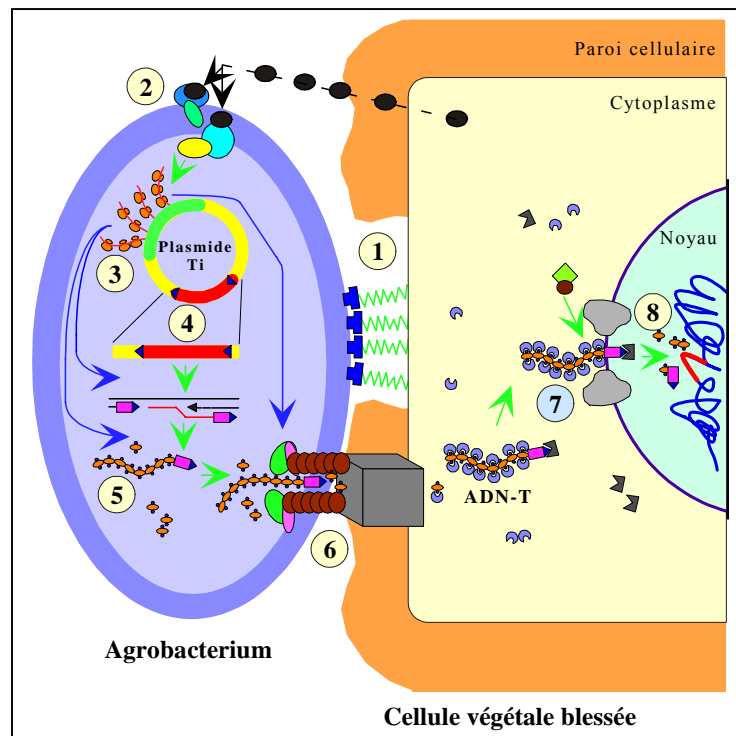


Figure 26: *Agrobacterium* est une bactérie gram négatif responsable de la galle du collet. Elle possède un plasmide Ti (Tumor induce) composé du T-DNA, la région qui s'intègre dans la plante, et des gènes *vir* (virulence) nécessaire pour l'intégration du T-DNA. Cette région est délimitée par deux répétitions directes de 25 paires bases appelées bord gauche et bord droit. L'infection par *Agrobacterium* se fait via une blessure de la plante. Une plante blessée libère des composés phénoliques, l'acétosyringone étant le plus efficace. Cette molécule déclenche tous les mécanismes d'insertion. Une des étapes importante pour qu'il y ait transformation est l'adhésion d'*Agrobacterium* à la plante blessée (1). L'acétosyringone se fixe sur le récepteur *virA* de la bactérie. Ce récepteur active le facteur de transcription *virG* en le phosphorylant(2). Une fois phosphorylé, *virG* active la transcription des autres gènes *vir* (3). *virD2*, accompagné d'autres protéines *vir*, reconnaît et excise le T-DNA (4). *VirE2* forme ensuite un manchon de protection autour du T-DNA simple brin pour qu'il ne soit pas dégradé une fois dans la plante (5). Les protéines *virB* et *virD4* forment un canal de transformation par où le T-DNA passe (6). Arrivé dans le cytosol de la plante, le T-DNA est adressé vers le noyau de la plante grâce aux séquences NLS, séquence d'adressage du noyau, des protéines *virD2* et *virE2* (7) Dans le noyau, le T-DNA s'intègre préférentiellement dans les zones de transcription (8).

Lors des repiquages hebdomadaires, de la kanamycine est rajoutée au milieu de culture, afin de sélectionner les cellules ayant intégré le T-DNA. En plus de la sélection en milieu liquide, des cellules ont été « coulées » sur milieu de callogenèse et ont été sélectionnées sur milieu solide. Plusieurs semaines, voire mois, sont nécessaires avant d'obtenir une culture en suspension transformée stable et exempte d'*Agrobacterium*. Ce même délai est nécessaire à l'obtention de cals à partir des cellules « coulées » sur milieu de callogenèse. Ne pouvant pas aller plus loin dans la caractérisation des transformants en voie de régénération, nous avons caractérisé les souches non transformées.

G. Cinétique de transcription des gènes *CycD3* et *BRH*

1 Mise au point de la RT-PCR semi-quantitative

Rappelons ici que nous voulons montrer l'impact de la pectine et d'oligomères pectiques sur l'action d'un récepteur hybride Wak1-bri1, via la transcription ou non de gènes de la réponse aux brassinostéroïdes. Les deux gènes que nous avons ciblés sont *CycD3* et

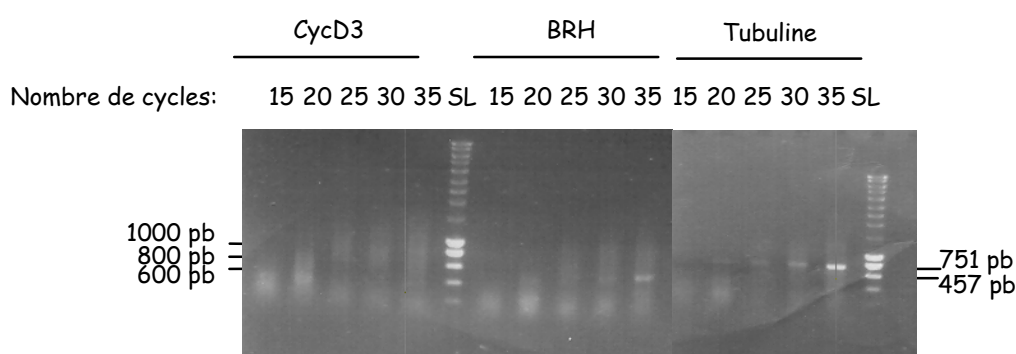


Figure 27 : Vérification sur gel d'agarose 1 % de la RT-PCR avec une température d'hybridation de 60 °C. La tubuline et *BRH* présentent une amplification respectivement à partir du 20^e et du 25^e cycle.

BRH. *CycD3* code pour une cycline spécifique de la voie des brassinostéroïdes ; tandis que *BRH* code pour un facteur de transcription réprimé lors cette même réponse. Les paragraphes suivant seront donc consacrés à l'analyse du niveau de transcription de ces deux gènes dans une culture en suspension d'*Arabidopsis thaliana* non transformée. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de la RT-PCR semi-quantitative. Pour pouvoir comparer les résultats obtenus, le niveau de transcription du gène la tubuline a été utilisé comme contrôle interne. Avant d'être utilisé, le protocole de cette technique nécessite quelques mises au point.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la température d'hybridation des amorces *CycD3*, *BRH* et tubuline. La première température que nous avons testée est la température théorique : 60 °C. Le protocole PCR utilisé est le suivant :

- Dénaturation pendant 5 minutes à 95°C
- Température de dénaturation : 95°C pendant 1 minute
- Température d'Hybridation : 60°C pendant 1 minute
- Température d'élongation : 72 °C pendant 3 minutes
- 35 cycles
- 72 °C pendant 10 minutes
- 4 °C à l'infini

Des prélèvements ont été effectués tous les cinq cycles à partir du 15^{ème} cycle jusqu'au 35^{ème} (figure 27). Ces différents prélèvements permettront de déterminer le nombre de cycles PCR nécessaires pour ne pas quitter la phase d'amplification exponentielle.

Durant cette première mise au point, on observe une bande d'amplification correspondant à la tubuline à partir du 20^{ème} cycle. Pour BRH, une faible amplification est observée à partir du 25^{ème} cycle. Pour CycD3, aucune amplification n'a été détectée. Sur base de ces résultats, nous pouvons constater que la température d'hybridation utilisée (60°C) ne convient finalement qu'à l'amplification de la tubuline.

Pour optimiser la température d'hybridation des amorces CycD3 et BRH, une PCR en gradient entre 65°C - 50°C a été réalisée. Le programme PCR utilisé est le suivant :

- Dénaturation pendant 5 minutes à 95°C
- Température de dénaturation : 95 °C pendant 1 minute
- Température d'Hybridation : 65°C → 50°C pendant 1 minute
- Température d'élongation : 72 °C pendant 3 minutes
- 35 cycles
- 72 °C pendant 10 minutes
- 4 °C à l'infini

Le résultat de cette PCR en gradient nous montre que la tubuline présente une amplification non spécifique lorsque la température d'hybridation est comprise entre 62,1 et 51,1°C (figure 28A). Pour BRH, une amplification est observée à 52,9 et 55,5 °C (figure 28B). Pour CycD3, une amplification est détectée à 55,5°C et 59,3°C (figure 28C). Dans les expériences ultérieures, la température d'hybridation utilisée pour BRH et CycD3 sera de 55°C et 60°C pour la tubuline.

Maintenant que la température d'hybridation est fixée, il nous reste à déterminer le nombre de cycles à utiliser pour la PCR et de déterminer la quantité d'ARN nécessaire pour la rétro-transcription pour chaque variété d'*Arabidopsis*.

Pour la mise au point de la rétro-transcription, deux quantités d'ARN total de départ ont été testées : 5 µg et 10 µg pour les deux variétés A-TL et LMM1. Trois PCR (une par paire d'amorces) ont été réalisées au départ du cDNA 1^{er} brin. Des prélèvements ont été effectués tous les cinq cycles à partir du 25^{ème} cycle jusqu'au 50^{ème} cycle et analysés sur gel d'agarose.

Pour la variété ATL, seule une faible amplification de BRH est détectée à partir du 30^{ème} cycle au départ de l'échantillon de 5 µg d'ARN total (figure 29). Au départ de 10 µg d'ARN total de cette même variété, une amplification de la tubuline, de BRH et de CycD3 est observée à partir du 30^{ème} cycle (figure 30). La phase d'amplification stationnaire est observée à partir du 40^{ème} cycle et ce pour les trois gènes.

Pour la variété L-MM1, les résultats obtenus à partir de 5 µg d'ARN total sont une amplification à partir du 30^{ème} cycle pour la tubuline et CycD3, et à partir du 25^{ème} cycle PCR pour BRH. La phase d'amplification stationnaire est observée à partir du 45^{ème} cycle pour la tubuline et BRH, et à partir du 50^{ème} cycle pour CycD3 (figure 31). Au départ de 10 µg d'ARN total, les résultats obtenus montrent une amplification à partir du 25^{ème} cycle pour la

tubuline et BRH, et à partir du 30^{ème} cycle PCR pour CycD3. La phase d'amplification stationnaire des trois gènes est atteinte au 40^{ème} cycle (figure 32).

De ces résultats, nous pouvons établir un programme PCR :

- Dénaturation pendant 5 minutes à 95°C
- Température de dénaturation : 95 °C pendant 1 minute
- Température d'Hybridation : 60°C pour la tubuline
55°C pour cycD3 et BRH] pendant 1 minute
- Température d'élongation : 72 °C pendant 3 minutes
- 35 cycles
- 72 °C pendant 10 minutes
- 4 °C à l'infini

Pour la rétro-transcription, nous pouvons déterminer la quantité d'ARN total de départ nécessaire pour chaque variété : 10 µg ARN total pour ATL et 5 µg ARN total pour L-MM1.

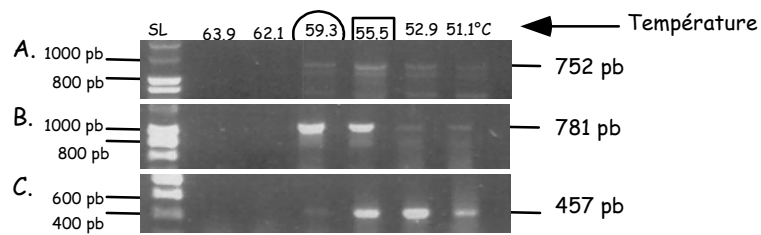


figure 28: Vérification sur gel d'agarose 1 % de la PCR en gradient. A. Tubuline ; B. BRH ; C. CycD3 Les températures qui ont été choisies sont entourée par un rectangle (CycD3 et BRH) et par un cercle (tubuline).

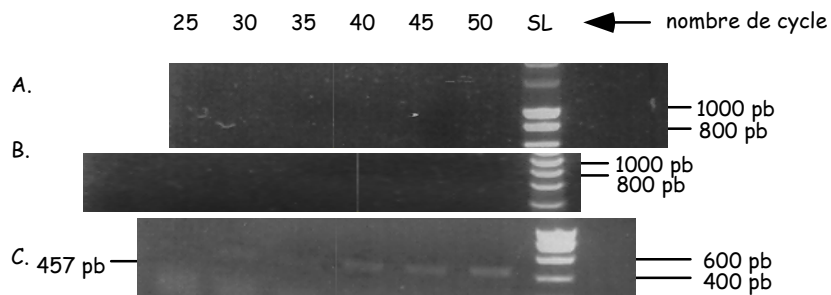


figure 29: Vérification sur gel d'agarose 1 % de la RT-PCR réalisée à partir de 5 μ g d'ARN total provenant de la variété ATL. A. tubuline ; B. CycD3 ; C. BRH.

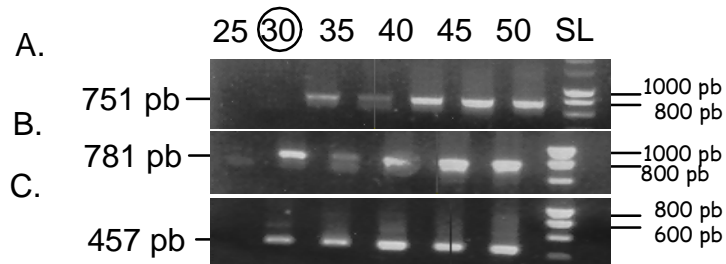


figure 30: Vérification sur gel d'agarose 1 % de la RT-PCR réalisée à partir de 10 μ g d'ARN total provenant de la variété ATL. A. Tubuline ; B. CycD3 ; C. BRH. Le nombre de cycle utilisé dans les expériences est indiqué par un cercle

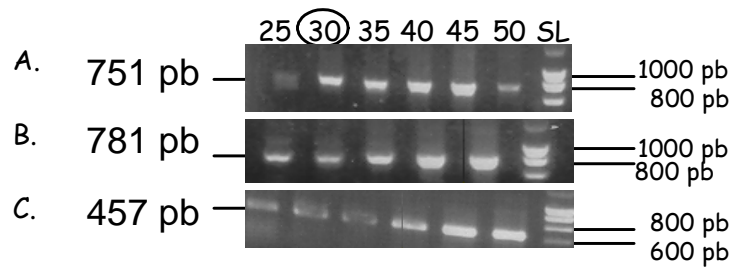


figure 31: Vérification sur gel d'agarose 1 % de la RT-PCR réalisée à partir de 5 μ g d'ARN total provenant de la variété Llm1. A. Tubuline ; B. CycD3 ; C. BRH. Le nombre de cycle utilisé dans les expériences ultérieures est indiqué par un cercle.

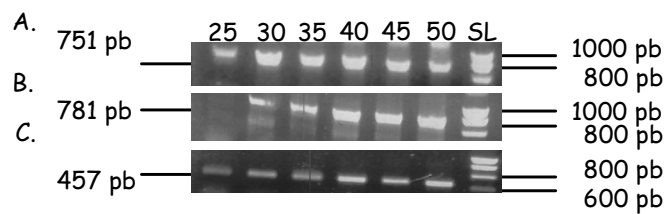


Figure 32: Vérification sur gel d'agarose 1 % de la RT-PCR réalisée à partir de 10 μ g d'ARN total provenant de la variété Llm1. A. Tubuline ; B. CycD3 ; C. BRH

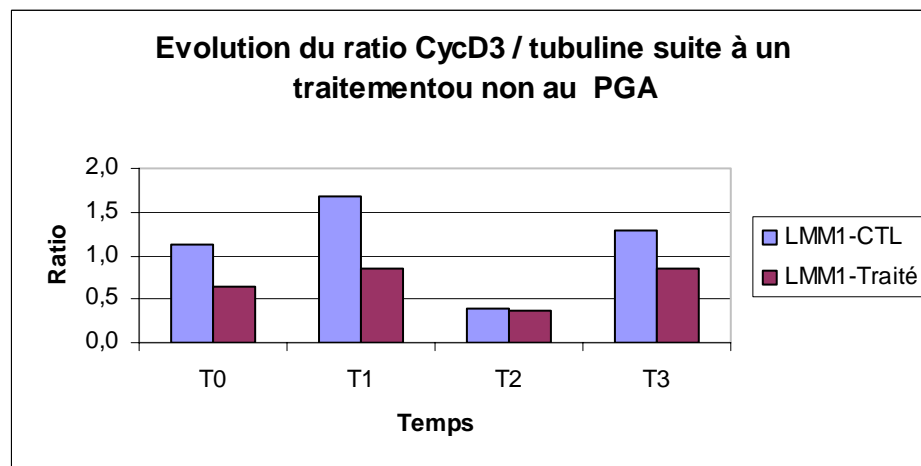
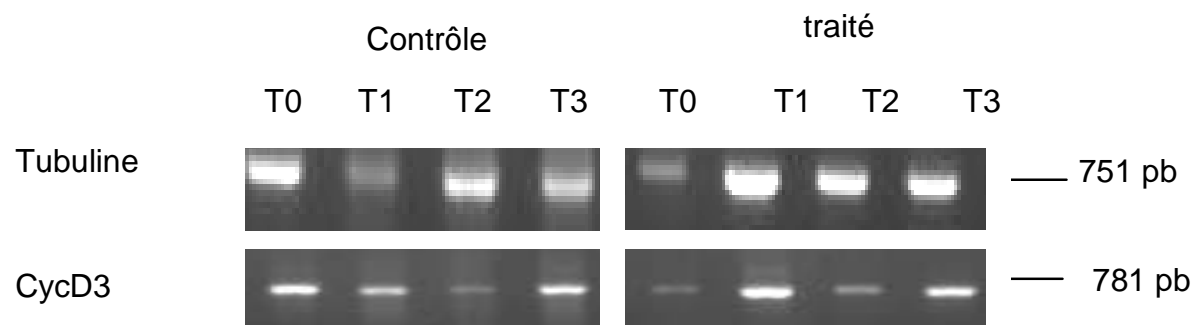


Figure 33 : A. Exemples d'amplification de CycD3 et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traités ou non au PGA. B. Evolution du rapport CycD3/tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traité ou non au PGA.

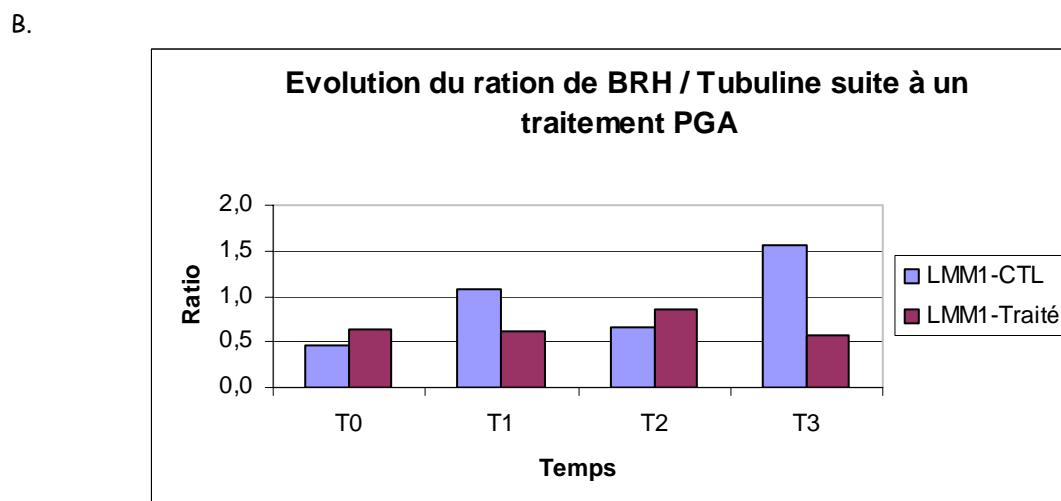
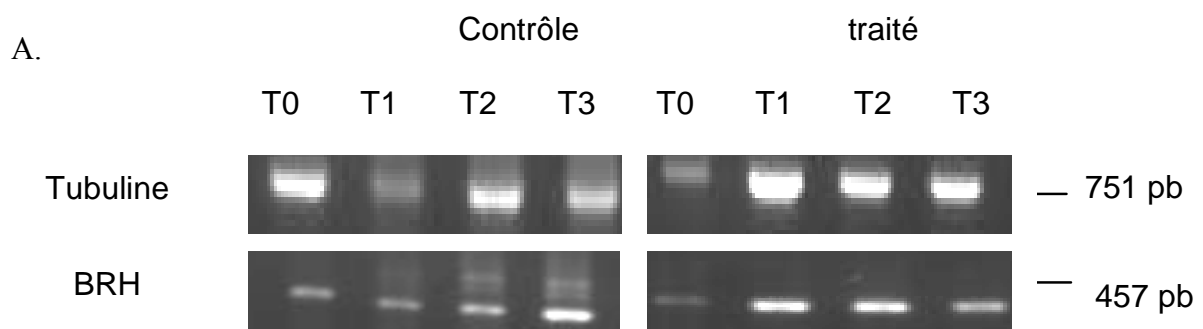


Figure 34 : A. Exemples d'amplification de BRH et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traités ou non au PGA. B. Evolution du rapport BRH/tubuline tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traité ou non au PGA.

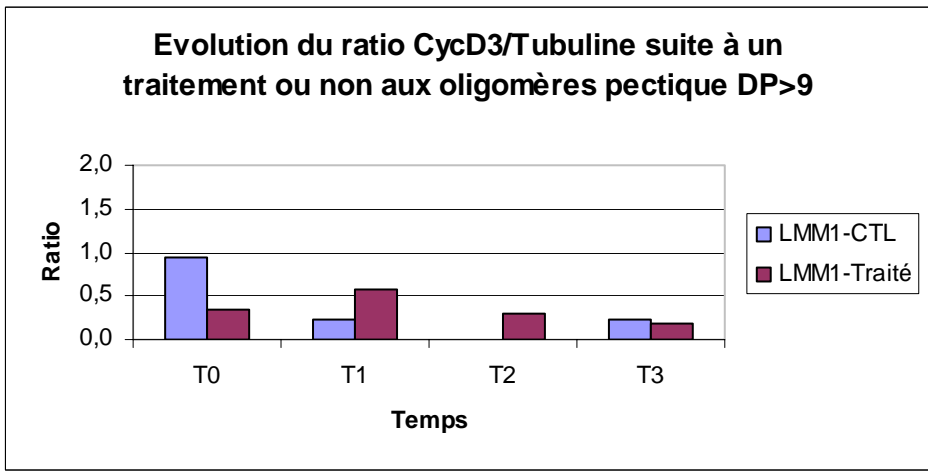
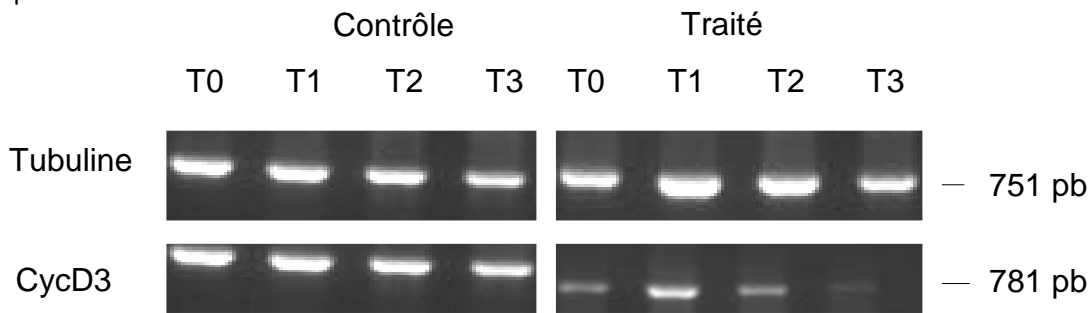
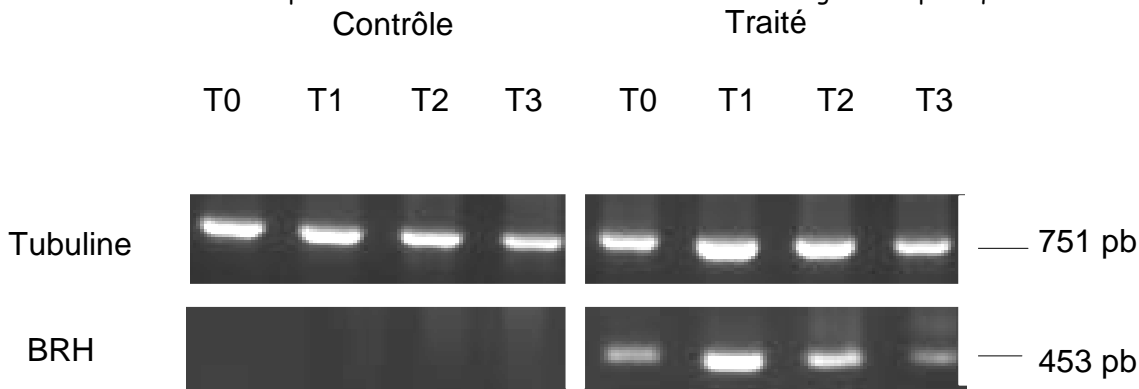


Figure 35 : A. Exemples d'amplification de CycD3 et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traités ou non aux oligomères pectiques. B. Evolution du rapport CycD3/tubuline tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traités ou non aux oligomères pectiques.



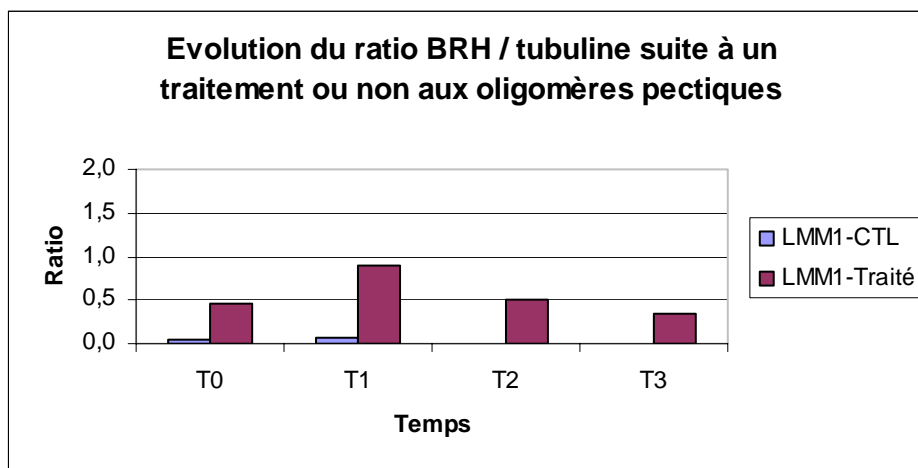


Figure 36 : A. Exemples d'amplification de BRH et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traités ou non aux oligomères pectiques. B. Evolution du rapport CycD3/tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *L-mm1* traités ou non au PGA.

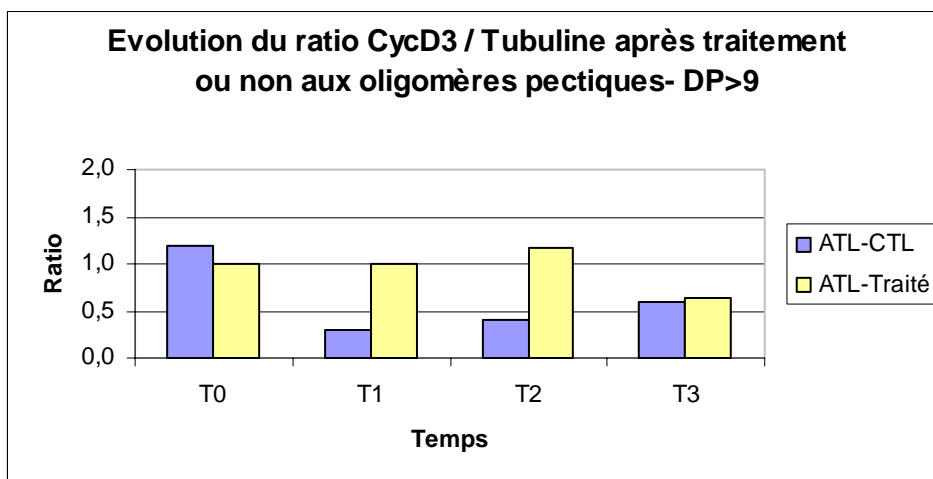
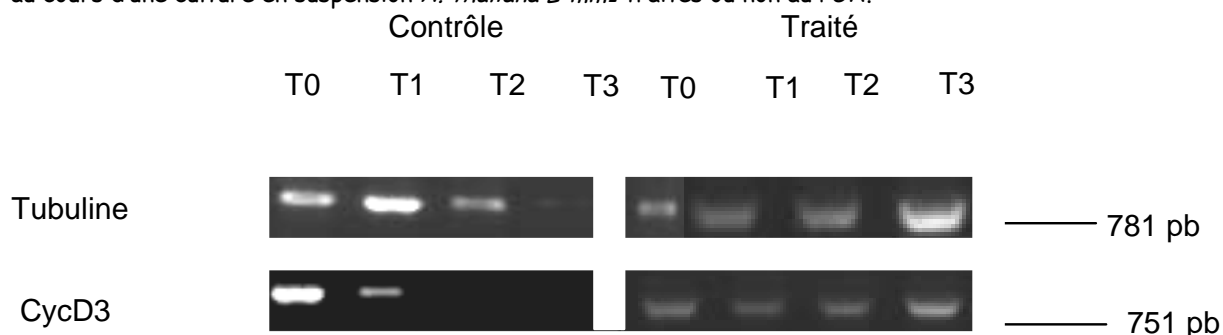


Figure 37 : A. Exemples d'amplification de CycD3 et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *ATL* traités ou non aux oligomères pectiques. B. Evolution du rapport CycD3/tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* *ATL* traités ou non aux oligomères pectiques.

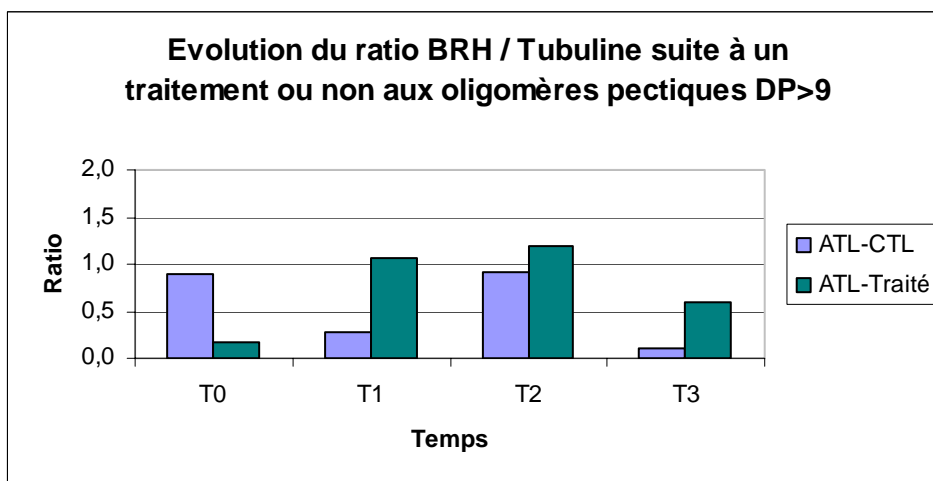
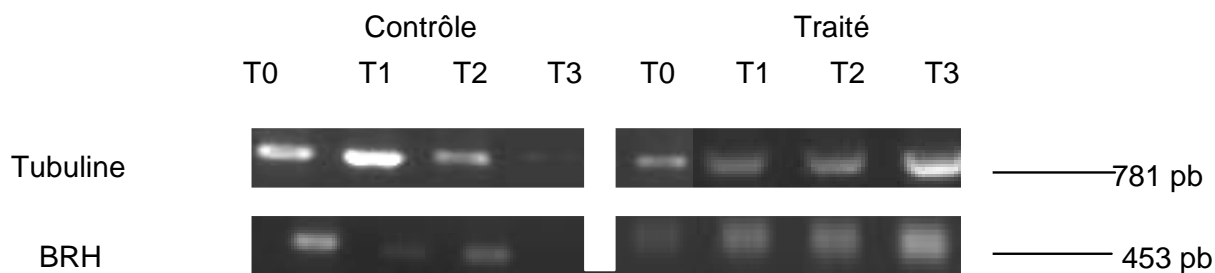


Figure 38 : A. Exemples d'amplification de BRH et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* ATL traités ou non aux oligomères pectiques. B. Evolution du rapport BRH/tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* ATL traités ou non aux oligomères pectiques.

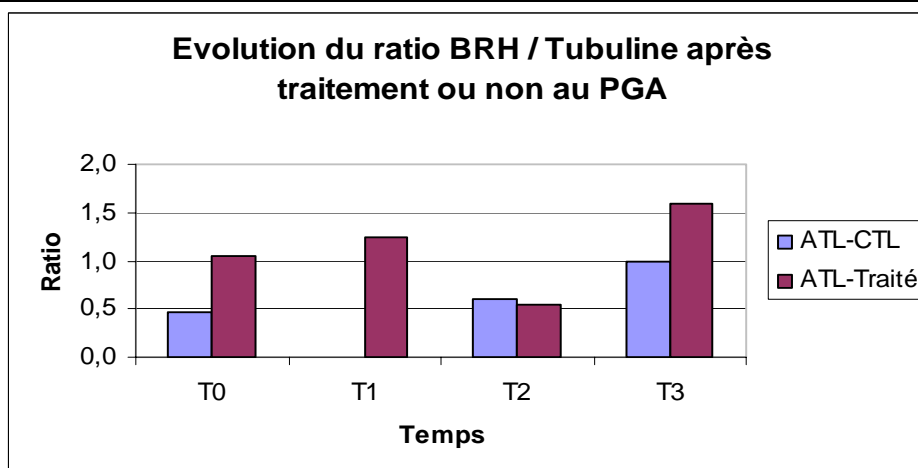
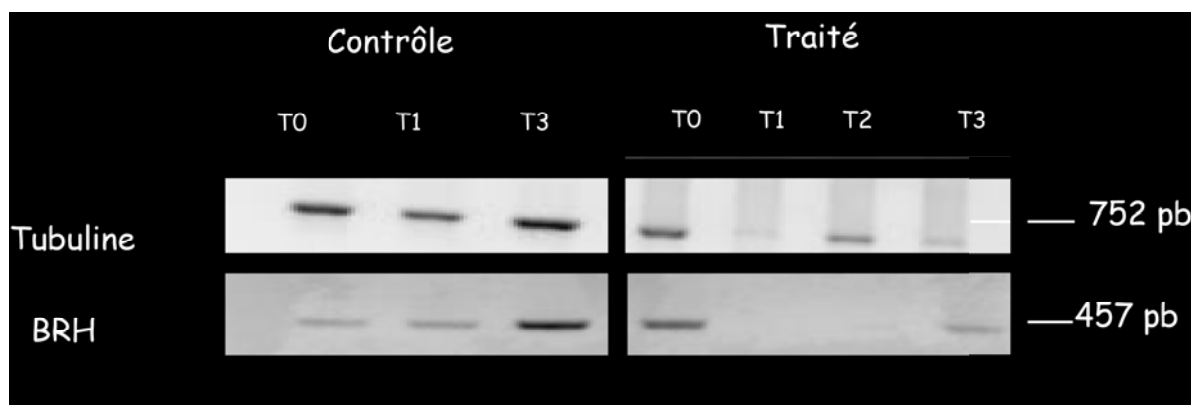


Figure 39 : A. Exemples d'amplification de BRH et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* ATL traités ou non aux PGA. B. Evolution du rapport BRH/tubuline tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* ATL traités ou non aux PGA.

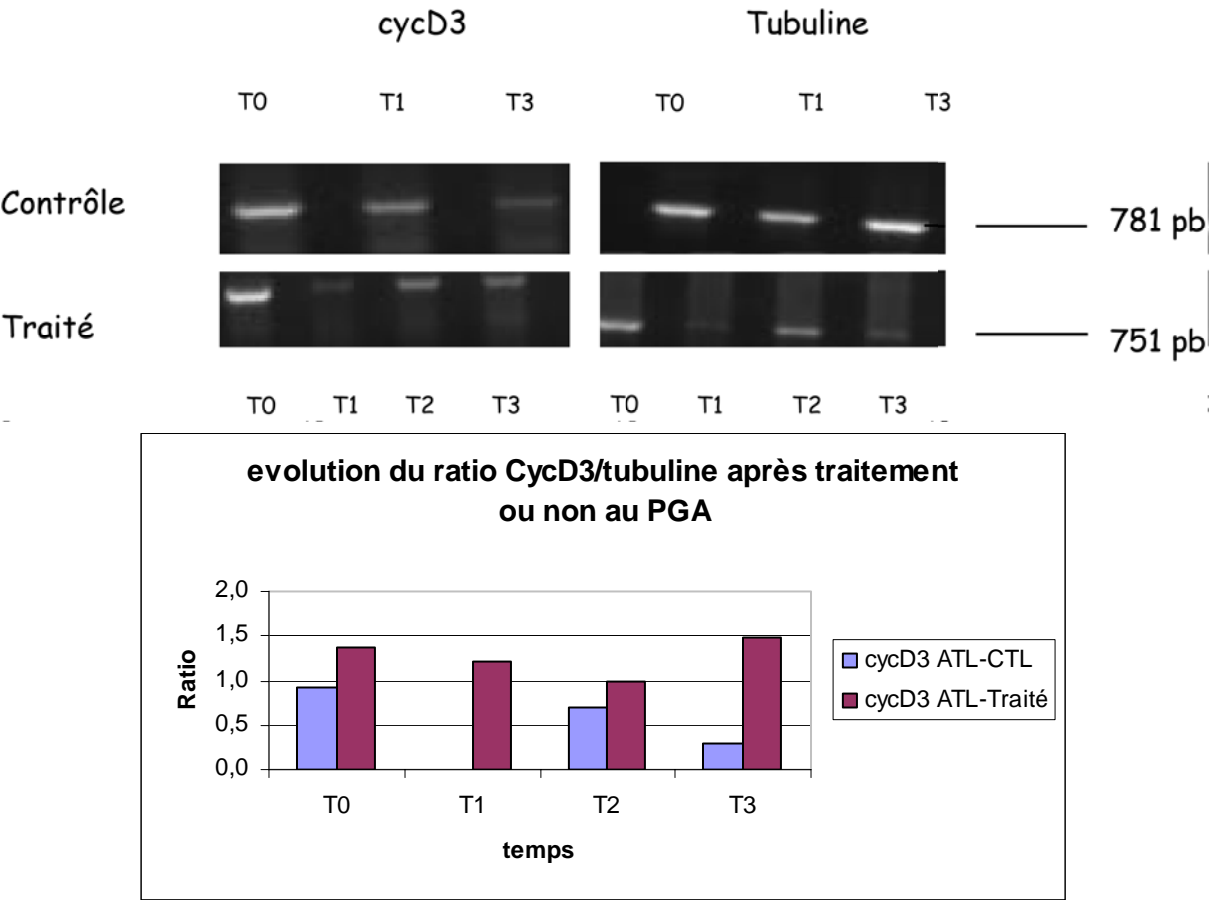


Figure 40 : A. Exemples d'amplification de CycD3 et de la tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* ATL traités ou non aux PGA. B. Evolution du rapport CycD3/tubuline tubuline au cours d'une culture en suspension *A. thaliana* ATL traités ou non aux PGA.

2. Cinétique de transcription des gènes CycD3 et de BRH dans les cellules non transformées

Comme dit précédemment, s'il y a effectivement activation du récepteur hybride Wak1-bri1 par le PGA ou les oligomères pectiques de $DP \geq 9$, nous devrions mesurer une augmentation de la transcription de CycD3 et une diminution de celle de BRH dans des expériences ultérieures. Pour montrer que cette augmentation, ou diminution, est bien due au récepteur hybride, deux contrôles doivent être effectués sur les cellules transformées.

Le premier contrôle consiste à mesurer le niveau de transcription basal de CycD3 et de BRH dans une culture en suspension non transformée et non traitée. Pour cela, l'ARN total des cellules de la culture en suspension a été extrait, rétro-transcrit et analysé par RT-PCR. Ces mesures ont été réalisées 3 jours après le repiquage (T0) jusqu'au repiquage suivant (T3).

Le deuxième contrôle consiste à mesurer le niveau de transcription de CycD3 et de BRH dans une culture en suspension non transformée traitée avec un éliciteur. Les éliciteurs que nous avons utilisés sont l'acide polygalacturonique (PGA) et des oligomères pectiques ayant un degré de polymérisation ≥ 9 . Ces deux éliciteurs sont, en effet, capables d'interagir avec le domaine extracellulaire de Wak1 (A. Decreux communications personnelles)

Les différents résultats obtenus pour les deux traitements sont présentés sur les figures 33 à 40.

Ces résultats ne présentent pas, à première vue, une évolution «assez variable» que ce soit pour les cellules contrôles que pour les cellules traitées, et ce pour les deux variétés d'*Arabidopsis thaliana*. Le peu de répétitions réalisées ne permettent pas d'aller plus loin à ce stade. Il faudra vérifier l'étendue de la variabilité entrevue par nos expériences avant de passer à l'étude des cellules transformées en voie de régénération.

IV. Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Par sa localisation en membrane et par son contact avec la paroi, le récepteur Wak1 pourrait jouer un rôle dans la communication extracellulaire de la cellule végétale. Un des ligands potentiels de ce récepteur est la pectine. Ce constituant de la paroi peut se lier au récepteur Wak1 et induire probablement une phosphorylation de celui-ci. La pectine s'étant avéré être, dans de nombreux cas, un éliciteur de nombreux phénomènes physiologiques tels que la réponse de défense contre les pathogènes ou encore l'élongation cellulaire (voir introduction), il serait intéressant de savoir si le récepteur Wak1 participe à la transduction du signal initiée par la pectine ou les fragments pectiques.

Dans le cadre de l'étude de l'activation du récepteur Wak1 par un constituant de la paroi, nous avons construit un récepteur hybride wak1-brl1. Ce récepteur devrait permettre de mettre en évidence une activation de Wak1 par la pectine via l'activation des gènes spécifiques de la voie des brassinostéroïdes.

Les cultures en suspension d'*Arabidopsis thaliana* que nous avons transformé avec cette construction hybride n'étant pas encore exemptes d'*Agrobacterium* et les cellules transformées étant en train de régénérer, la construction n'a pas encore pu être testée.

Les premières mesures du taux de transcription des gènes CycD3 et BRH au départ de cultures non transformées mais traitées ou non aux oligomères pectiques et aux PGA ne permettent pas de tirer de conclusions : les données obtenues jusqu'à présent sont insuffisantes et assez variables. Ces résultats préliminaires devront donc être complétés de mesures supplémentaires qui permettront des analyses statistiques et d'avoir une meilleure idée de la variabilité de la RT-PCR et de la variabilité d'échantillons à échantillons. Si après avoir réalisé plusieurs fois l'expérience (traitement, extraction et RT-PCR) et que de la variabilité est toujours observée, il serait probablement utile de synchroniser les cultures en suspension. N'oublions pas que nous essayons de mesurer le niveau de transcrits des gènes CycD3 et BRH impliqués dans la division cellulaire brassinostéroïdes-dépendante. Cette synchronisation de la culture permettrait aux cellules végétales de se diviser toute en même temps et par la même occasion de synchroniser l'expression de CycD3 et de BRH. Pour effectuer une telle synchronisation, il suffirait de traiter les cultures en suspension avec des agents chimiques tels que la roscovitine (inhibiteur des CDK (cycline-dépendent kinase)) ou l'aphidicoline (inhibiteur de DNA polymérase α et δ) qui bloquent respectivement les cellules en phase G1/S ou G2/M et la progression de G1 en S de façon réversible (Planchais et al. 2000).

Lorsque les cellules en suspension seront disponibles, celles-ci devront être caractérisées. Dans un premier temps, il faudra déterminer s'il y a bien eu insertion du T-DNA dans l'ADN de la plante. Pour cela, une PCR, avec les amorces Vanwakg et Vanbrid, devra être réalisée à partir de l'ADN génomique obtenus à partir de cellules transformées. Pour vérifier que l'ADN de plantes n'est pas contaminé par l'ADN d'*Agrobacterium*, une PCR contrôle avec des amorces spécifiques d'*Agrobacterium* devra aussi être réalisée.

Dans un second temps, il sera également nécessaire de déterminer par Southern blot le nombre d'insertion du T-DNA dans le génome de la plante et, éventuellement déterminer le ou les sites d'insertion dans l'ADN de la plante par la technique du Génome walker.

Il faudra également montrer que le gène codant pour le récepteur hybride est transcrit et exprimé en utilisant la technique de RT-PCR ou le Northern blot.

Avec des anticorps spécifiques du récepteur hybride, il sera nécessaire de vérifier par Western blot que la protéine hybride est exprimée en membrane. Pour cela, nous pourrons réaliser une extraction des protéines de la membrane des cellules en suspension transformées et les analysées par western blot ou par immunolocalisation sur coupes.

Après l'ensemble de ces vérifications, les cellules transformées pourront être traitées avec des oligomères pectiques et aux PGA. Les niveaux de transcription des gènes de la cycline *CycD3* et du facteur de transcription *BRH* seront ensuite mesurés par la RT-PCR semi-quantitative. Ces mesures devront être comparées à celles obtenues pour les cellules non transformées. Si l'on constate que les traitements aux PGA ou aux oligomères pectiques induisent une augmentation de la transcription de *CycD3* ou une diminution de *BRH* significativement différente à celle obtenue chez les cellules non transformées, nous pourrons conclure que la pectine est un ligand de wak1.

Ces résultats pourraient être confirmés par la réalisation de deux constructions contrôles. La première aurait le domaine kinase de *bri1* muté et la seconde aurait une mutation au niveau du site de liaison de la pectine. En ce qui concerne la mutation du site de fixation de la pectine au niveau du domaine extracellulaire de Wak1, certains acides aminés probablement impliqués dans la liaison de la pectine ont été identifiées au laboratoire. Il a, en effet, été démontré que la mutation simultanée de trois acides aminés présents hors du domaine EGF-like permet de diminuer fortement la liaison de la pectine au domaine extracellulaire de Wak1. Si la pectine est effectivement un ligand capable d'activer Wak1, ces deux constructions devraient donner des résultats similaires à ceux obtenus au départ des cellules non transformées.

V. Bibliographie

1. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815 (2000).
2. Ae Ran Park, S. K. C., Ui Jeong Yun, Mi Young Jin, Seoung Hyun Lee, Gilberto Sachetto-Martins, and Ohkmae K. Park. Interaction of the *Arabidopsis* Receptor Protein Kinase Wak1 with a Glycine-rich Protein, AtGRP-3. *J. Biol. Chem.* **276**, 26688-26693 (2001).
3. Anderson, C. M., Wagner, T. A., Perret, M., He, Z. H., He, D. & Kohorn, B. D. WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Mol Biol* **47**, 197-206 (2001).
4. Becraft, P. W. Receptor kinase signaling in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**, 163-192 (2002).
5. Bent, A. F. *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol* **124**, 1540-7 (2000).
6. Bisseling, T. The role of plant peptides in intercellular signalling. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 365-8 (1999).
7. Bouquin, T., Meier, C., Foster, R., Nielsen, M. E. & Mundy, J. Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiol* **127**, 450-8 (2001).
8. Buer, C. S., Wasteneys, G. O. & Masle, J. Ethylene modulates root-wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1085-96 (2003).
9. Carpin, S., Crevecoeur, M., de Meyer, M., Simon, P., Greppin, H. & Penel, C. Identification of a Ca(2+)-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* **13**, 511-20 (2001).
10. Chen, N., Upcroft, J. A. & Upcroft, P. A new cysteine-rich protein-encoding gene family in *Giardia duodenalis*. *Gene* **169**, 33-38 (1996).
11. Chen, Z. A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant Physiol* **126**, 473-6 (2001).
12. Clouse, S. D. Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol Cell* **10**, 973-82 (2002).
13. Clouse, S. D. Brassinosteroid signaling: novel downstream components emerge. *Curr Biol* **12**, R485-87 (2002).
14. Cock, J. M., Vanoosthuyse, V. & Gaude, T. Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 230-6 (2002).
15. Coello, P., Sassen, A., Haywood, V., Davis, K. R. & Walker, J. C. Biochemical characterization and expression of RLK4, a receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **142**, 83-91 (1999).
16. Cosgrove, D. J. Plant cell walls: wall-associated kinases and cell expansion. *Curr Biol* **11**, R558-9 (2001).
17. Dievart, A. & Clark, S. E. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 507-516 (2003).
18. Ferrando, A., Farras, R., Jasik, J., Schell, J. & Koncz, C. Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J* **22**, 553-60 (2000).

19. Gomez-Gomez, L. & Boller, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**, 251-6 (2002).
20. Guo, H. & Ecker, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 40-9 (2004).
21. Haecker, A. & Laux, T. Cell-cell signaling in the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 441-6 (2001).
22. Hardie, D.G. Plant proteine-serine/threonine kinases : classification into subfamilies and overview of function (2000) in *Botanical Research* **32** 1-44 edited by Kreis M. & Walker J-C
23. He, Z., Wang, Z. Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P. & Chory, J. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**, 2360-3 (2000).
24. He, Z. H., Cheeseman, I., He, D. & Kohorn, B. D. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **39**, 1189-96 (1999).
25. He, Z. H., Fujiki, M. & Kohorn, B. D. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *J Biol Chem* **271**, 19789-93 (1996).
26. He, Z. H., He, D. & Kohorn, B. D. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J* **14**, 55-63 (1998).
27. Hellgren, G., Lofqvist, C., Wikland, K. A., Carlsson, B. & Carlsson, L. M. S. Construction of a soluble human GH-receptor/EGF-receptor hybrid and its activation by GH. *Cytokine* **25**, 260-264 (2004).
28. Hiscock, S. J. & McInnis, S. M. Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: Brassica and beyond. *Trends Plant Sci* **8**, 606-13 (2003).
29. Holt, B. F., Hubert, D. A. & Dangl, J. L. Resistance gene signaling in plants - complex similarities to animal innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **15**, 20-25 (2003).
30. Howell, S. H., Lall, S. & Che, P. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Sci* **8**, 453-9 (2003).
31. Hu, Y., Bao, F. & Li, J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *Plant J* **24**, 693-701 (2000).
32. Jones, D. A. & Takemoto, D. Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr Opin Immunol* **16**, 48-62 (2004).
33. Kakimoto, T. Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 399-403 (1998).
34. Kohorn, B. D. Shuffling the deck: plant signalling plays a club. *Trends Cell Biol* **9**, 381-3 (1999).
35. Kohorn, B. D. WAKs; cell wall associated kinases. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 529-33 (2001).
36. Kohorn, B. D., Lane, S. & Smith, T. A. An Arabidopsis serine/threonine kinase homologue with an epidermal growth factor repeat selected in yeast for its specificity for a thylakoid membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10989-92 (1992).
37. Konck, C., Martini, N., Szabados, L., Hroudá, M., Bachmair, A., Schell, J.,. Specialized vectors for gene tagging and expression studies. - In: *Gelvin, S.B.*,

- Schilperoort, R.A. (Eds.) Plant Molecular Biology Manual B2, . pp. 1-22.t (1994).*
38. Lally, D., Ingmire, P., Tong, H. Y. & He, Z. H. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *Plant Cell* **13**, 1317-31 (2001).
 39. Lease, K. A., Lau, N. Y., Schuster, R. A., Torii, K. U. & Walker, J. C. Receptor serine/threonine protein kinases in signalling: analysis of the erecta receptor-like kinase of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **151**, 133-143 (2001).
 40. Lindsey, K., Casson, S. & Chilley, P. Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends Plant Sci* **7**, 78-83 (2002).
 41. Liners, F. T., J-F. Van Cutsem P. Influence of the degree of polymerisation of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiol.* **99**, 1099-1104 (1992).
 42. Mathur, J., Szabados, L., Schaefer, S., Grunenberg, B., Lossow, A., Jonas-Straube, E., Schell, J., Koncz, C. & Koncz-Kalman, Z. Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *Plant J* **13**, 707-16 (1998).
 43. Messiaen, J. V. C., P. Pectic Signal Transduction in Carrot Cells: Membrane, Cytosolic and Nuclear Responses Induced by Oligogalacturonides. *Plant cell Physiology* **35**, 677-689 (1994).
 44. Molnar, G., Bancos, S., Nagy, F. & Szekeres, M. Characterisation of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 127-33 (2002).
 45. Montesano, M., Brader, G. & Palva, E. T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* **4**, 73-79 (2003).
 46. Morris, E. R. & Walker, J. C. Receptor-like protein kinases: the keys to response. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 339-42 (2003).
 47. Mussig, C. & Altmann, T. Brassinosteroid signaling in plants. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 398-402 (2001).
 48. Penel, C. V. C. P. G. H. intreractions of a plant peroxydase with oligogalacturoniques in the presence of calcium ions. *phytochemistry* **51**, 193-198 (1999).
 49. Planchais, S., Glab, N., Inze, D. & Bergounioux, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett* **476**, 78-83 (2000).
 50. Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G. & Shoyab, M. Ligand-Specific Activation of Her4/P180(ErbB4), a 4th Member of the Epidermal Growth-Factor Receptor Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 1746-1750 (1993).
 51. Redman, J. C., Haas, B. J., Tanimoto, G. & Town, C. D. Development and evaluation of an *Arabidopsis* whole genome Affymetrix probe array. *Plant J* **38**, 545-61 (2004).
 52. Rideley B.L., O. N. M. A., Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *phytochemistry* **57**, 929-967 (2000).
 53. Ridley, B. L., O'Neill, M. A. & Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-67 (2001).
 54. Riou, C., Herve, C., Pacquit, V., Dabos, P. & Lescure, B. Expression of an *Arabidopsis* lectin kinase receptor gene, lecRK-a1, is induced during senescence, wounding and in response to oligogalacturonic acids. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 431-438 (2002).

55. Schaller, G.E. Histidine kinases and the role of two-component systems in plant (2000). In *Botanical Research* **32**, 109-148 edited by Kreis M. & Walker J.C.
56. Schulze-Muth, P., Irmeler, S., Schroder, G. & Schroder, J. Novel type of receptor-like protein kinase from a higher plant (*Catharanthus roseus*). cDNA, gene, intramolecular autophosphorylation, and identification of a threonine important for auto- and substrate phosphorylation. *J Biol Chem* **271**, 26684-9 (1996).
57. Schumacher, K. & Chory, J. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 79-84 (2000).
58. Shah, J. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 365-71 (2003).
59. Shiu, S. H. & Bleecker, A. B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10763-10768 (2001).
60. Spaink, H. P. Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases. *Trends Microbiol* **12**, 201-4 (2004).
61. Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E. & Nasrallah, J. B. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8816-20 (1991).
62. Tichtinsky, G., Vanoosthuyse, V., Cock, J. M. & Gaude, T. Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends Plant Sci* **8**, 231-7 (2003).
63. Tordai, H., Banyai, L. & Patthy, L. The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Lett* **461**, 63-7 (1999).
64. Torii, K. U. Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 361-7 (2000).
65. Torii, K.U. & Clark S.E. Receptor-like kinases in plant development (2000) in *Botanical Research* **32** 225-267 edited by Kreis M. & Walker J-C
66. Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* **5**, 67-74 (2000).
67. Verica, J. A. & He, Z. H. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiol* **129**, 455-9 (2002).
68. Wagner, T. A. & Kohorn, B. D. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**, 303-18 (2001).
69. Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M. & Lawton, M. The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2598-602 (1996).
70. Wu, H. X., McCormac, A. C., Elliott, M. C. & Chen, D. F. Agrobacterium-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **54**, 161-171 (1998).
71. Yin, D., Gavi, S., Wang, H. Y. & Malbon, C. C. Probing receptor structure/function with chimeric G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **65**, 1323-32 (2004).
72. Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T. & Chory, J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181-91 (2002).

73. Zhang, S. Q. & Klessig, D. F. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520-527 (2001).